

Estudio citológico y experimental de *Leptosphaeria Cavanillesii*, nov. sp.,

por

M. J. de Urríes ⁽¹⁾

1) PARTE DESCRIPTIVA

A) ANTECEDENTES.

El género *Leptosphaeria*, aun en las publicaciones más recientes, ocupa una posición incierta y se duda de si todas las formas, que tan fácilmente se pueden incluir en este género entendido al modo clásico (Syll. Fung.), están relacionadas entre sí, o si se trata de un mero fenómeno de convergencia entre especies de significación sistemática muy diferente.

El Prof. Cámara (1932) lo descompone en los cuatro siguientes:

Leptosphaeria Ces. et de Not.

Leptosphaerella Sacc.

Dendroleptosphaeria, nov.

Lopholeptosphaeria, nov.

No es sólo de ahora el problema del género *Leptosphaeria*. Establecido por Cesati y de Notaris (1863), comprendía tanto especies con esporas hialinas como con esporas coloreadas. Saccardo (1883) estableció el género *Metasphaeria* para las especies con esporas hialinas.

V. Höhnelt (1918 a), en un trabajo que dedica al género *Leptosphaeria*, se ocupa de una abundante sinonimia del mismo (cuestión en que no quiero entrar) y señala su carácter mixto. Distingue un grupo de especies de naturaleza esferiácea, que pasa al género *Nodulosphaeria* Rab. (1858), y otro grupo de naturaleza dotideácea, que comprende, entre otras, la especie tipo del género *Leptosphaeria*.

Por tanto, *Leptosphaeria* auct., se descompone en:

Nodulosphaeria Rab. (esferiáceo).

Leptosphaeria Ces. et de Not. (dotideáceo).

(1) Trabajo realizado en el Laboratorio de Micología del Jardín Botánico de Madrid.

En otra publicación (Von Höhnel 1918 b), estableció el género *Scleropleella* (Pseudosferiáceo), en el que incluye algunas formas tenidas anteriormente por *Leptosphaeria*.

Añade en su trabajo que la mayoría de las genuinas especies de *Leptosphaeria* (dotideáceo), tienen fructificaciones (que él llama dotitecios) sin rastro de estroma y que parecen auténticas peritecas. Otras son cespitosas y aún reunidas por un estroma común. Como se ve, V. H. tenía una idea de los Dotideáceos muy distinta de la corriente.

La filiación del género *Leptosphaeria* es un problema que se relaciona con una de las cuestiones más debatidas en la interpretación del clásico grupo de los Pirenomicetos.

Desde que V. Höhnel establece (1907) su familia de los Pseudosferiáceos, se inicia, por un numeroso grupo de investigadores, estudios anatómicos, de resulta de los cuales se sucede un ininterrumpido trasiégo de especies y géneros anteriormente considerados como Esferiáceos o Dotideáceos.

Aunque hoy día, como consecuencia de los trabajos a que me he referido, el conocimiento de estas formas ha adelantado extraordinariamente, pero aún continúa siendo tema de comentario y controversia, en todas las revistas especializadas, la naturaleza dotideal, esferial o pseudoesferial de determinadas especies. (Véase p. ej. Miller and Gw. Buston, 1943; o Petrak, 1936 y 1940).

En 1907, V. Höhnel (loc. cit.) estableció la familia Pseudosferiáceos, con los géneros *Wettstenina* y *Pseudosphaeria*, caracterizada como sigue: «Stromata klein, eingewachsen, perithezium-ähnlich, mit mehreren nebeneinander stehenden Lokuli, die je einen Askus enthalten». Se trata, pues, de hongos de aspecto de Esferiáceos, pero cuyas ascas están separadas entre sí por tabiques celulares. Lo que parece periteca es, en realidad, un estroma con varios lóculos uniasciferos. El parecido con los Esferiáceos se acentúa porque los lóculos son pequeños, están muy juntos unos de otros, y sólo están separados por una o pocas capas celulares; por lo que, al madurar las ascas, por gelificación de estas células, pueden fusionarse en parte los lóculos.

A estos dos géneros primeros, añadió, en diversas publicaciones, otros más, entre ellos el ya citado *Scleropleella* (1918).

Las relaciones y diferencias con los Dotideales, puede decirse que las concibe así (1909):

Pseudosferiáceos V. H.: Estromas con lóculos uniasciferos.

Dotideáceos: Estromas con lóculos poliasciferos.

Petrak (1923) supone que, en opinión de V. H., los Pseudosferiáceos y los Esferiáceos, formarían dos series paralelas con relaciones mutuas laterales.

Pero a mí me parecen bien claras, a este respecto, las líneas que copio de un trabajo del fundador de los Pseudosferiáceos (V. H. 1918c, p. 166), en el que polemiza con Theissen (polémica que no había de terminar hasta la muerte de este último):

«..... dürfen zu den Pseudosphaeriaceen nur solche Gattungen gestellt worden, welche als Anfangsglieder einer Reihe betrachtet werden können, die zu den Sphaeriaceen führen».

Theissen (1916) tiene el acierto de señalar una diferencia esencial entre dos formaciones a veces muy parecidas; idea fundamental para comprender

las verdaderas relaciones de los Pseudosferiales y de los Ascomicetos en general; me refiero al problema de los parafisos.

Theissen da una norma para distinguir entre «parafisos verdaderos» y lo que él llama «fibras intertecales parafisoides», a veces muy difíciles de diferenciar de los primeros en fructificaciones maduras. Los parafisos verdaderos, según él, tienen el extremo libre; las fibras parafisoides no tienen tal extremo libre y se continúan con la parte superior de la fructificación.

Un poco después, este mismo investigador (1918), comunica que casi todos los Dotideáceos tienen «núcleo» pseudosferiáceo; es decir, sus lóculos no son poliascíferos, como pretendía V. H., sino que cada uno está formado a su vez por un conjunto de lóculos uniascíferos.

Separados así por Theissen los Pseudosferiáceos de los Esferiáceos, por la posesión de parafisoides o parafisos verdaderos, respectivamente, resta considerar su punto de vista respecto a las relaciones entre Pseudosferiáceos y Dotideáceos, ambos de estructura análoga (núcleo pseudosferiáceo).

En un trabajo en colaboración (Th. y Syd., 1918), declara que estos dos grupos (en tal trabajo considerados como órdenes) de Dotideales y Pseudosferiales, se comportan, respectivamente, como los Esferiáceos «simplices» respecto de los «composita».

Por ese mismo tiempo aún escribe V. H. (1918, pág. 82):

«Dieses Verwachsensein der Enden der Paraphysen mit dem Deckengewebe scheint von Theissen als ein Beweis dafür angesehen zu werden, dass es sich nicht um Paraphysen handelt. Das ist aber unrichtig denn wahrscheinlich alle Paraphysen sind anfänglich oben angewachsen».

Petrak, en un muy documentado trabajo (1923), expone su idea acerca de esta cuestión. Entre otras, estudia varias especies de *Leptosphaeria*, y encuentra que tales formas pueden ordenarse, atendiendo a detalles de su estructura, en una serie, uno de cuyos extremos corresponde a especies pseudosferiales, que V. H. colocó en el género *Scloropleella*; el otro extremo está representado por especies «esferiales genuinas». Lo mismo ocurre con otros géneros. En el mismo trabajo distingue cuatro grados de diferenciación estructural de las peritecas (1).

Este modo de interpretar los Pseudosferiáceos como un conjunto de formas sencillas, relacionadas más directamente con otros géneros de Esferiáceos que entre sí, ha dado motivo para que se atribuya a Petrak (Nannfeldt, por ejemplo), como a V. Höhnelt, la idea difícilmente explicable de hacer derivar las formas con «verdaderos parafisos» (con extremos libres desde su aparición) de otras formas con fibras parafisoides (con extremos soldados a la parte superior de la fructificación).

Yo no deduzco eso de sus trabajos, y me parece muy importante en relación con esto lo que escribe (*loc. cit.*, p. 65):

«Die sphaerialen Gattungen nach den Baue ihres Nukleus vorläufig auf zwei prinzipiell verschiedene Entwicklungsreihen verteilen, welche streng auseinander gehalten werden müssen». Una de estas series corresponde a las

(1) Remito al lector a tan importante trabajo para los detalles del mismo.

formas con núcleo pseudosferial; a la otra pertenecen todos los géneros con núcleo diaporteo.

En lo que si está poco afortunado Petrak, es en reunir, dentro de un mismo grupo (Esferiáceos), géneros que pertenecen a dos series «prinzipl. verschiedene», que para decirlo también con sus mismas palabras, «streng auseinander gehalten werden müssen».

En escritos posteriores (1936, p. 48), sin embargo, habla de series evolutivas: «serie dotideal» y «serie esferial».

Tampoco tiene fortuna en los nombres con que designa las distintas categorías de parafisos, que creo de utilidad reproducir.

Tipo dotideal o pseudosferial:

1.º Sin parafisos, el tejido parenquimático del núcleo sufre histólisis mucilaginoso.

2.º Parafisos, más o menos fibrosocelulares, formados por células del tejido parenquimático central comprimidas. A estas formas primitivas de parafisos, llama *Parafisoides*.

3.º Parafisos más o menos fuertes y ramificados, no gelificables, soldados arriba con la membrana peritecal.

Tipo diaporteo:

1.º Sin pseudoparafisos

2.º Pseudoparafisos articulados, anchos, muy gelificables.

3.º Pseudoparafisos generalmente no articulados, delgados, no gelificables, no soldados arriba a la membrana de la periteca. A estos llama *Metafisos*.

Nótese cómo los parafisos verdaderos son para Petrak exactamente lo contrario que para Theissen y, con éste, casi todos los demás investigadores. Esto ha sido, en muchos casos, motivo de confusión bien explicable. Lo mismo ocurre con el término parafisoide, ya empleado antes en otro sentido.

Miller (1928) señala las tres características de los Esferiáceos que deduce de sus propias investigaciones en este grupo:

1.º Existencia de pared peritecal genuina.

2.º Existencia de poro genuino revestido de perifisos.

3.º Existencia de verdaderos (es decir, libres en el extremo) parafisos.

Nannfeldt (1932), por último, a la vista de los resultados obtenidos por anteriores investigadores, acertadamente distingue en los Eu ascomicetos, aparte los Plectascales, dos grandes grupos, que corresponden a los dos tipos estructurales fundamentalmente distintos, y, por tanto, a los dos tipos principales de «parafisos» que ya había distinguido Theissen:

Ascoloculares (Nannfeldt): con ascas alojadas en lóculos.

Ascohimenciales (Nannfeldt): con ascas, formando con los parafisos un himenio auténtico.

Estas ideas son compartidas por la mayor parte de los autores modernos; pero, si parece que se ha llegado a una situación más estable, quedan aún muchos puntos por aclarar.

Beasey (1935), por ejemplo, coloca la familia *Pleosporaceae* dentro del orden *Sphaeriales* y no entre los *Pseudosphaeriales*; cree que no está suficientemente justificada su inclusión en los Pseudosferiales de Theissen y Sydow o Ascoculares de Nannfeldt, mientras no se conozca mejor su ontogenia (1).

Refiriéndose este mismo autor a las especies de *Leptosphaeria* con parafisos delgados, como los demás micólogos modernos, dice que no los considera como formas intermedias entre Esteriales y Pseudosphaeriales, por el origen distinto de los parafisos en uno y otro caso.

Cuando trata del orden *Pseudosphaeriales* y ha descrito su estructura, se expresa así (p. 209):

«Careful investigation has shown that many species formerly assigned to the genera *Pleospora* and *Leptosphaeria* (Family *Pleosporaceae*, Order *Sphaeriales*) have the foregoing structure, hence must be transferred to this order», y añade:

«Just how far this may apply to the many remaining species of those and other genera can be determined only by careful study of the development of the young perithecia».

Es esta, por lo tanto, una cuestión que debe resolverse en cada caso, y de ahí el interés que sigue teniendo el estudio citológico y anatómico del desarrollo de la fructificación en una especie de *Leptosphaeria*.

B) TRABAJO ORIGINAL.

a) Técnica seguida.

Cuando estaba estudiando la germinación de las esporas de *Tr. Azaræ* (2), en una de las gotas pendientes que contenía una suspensión de esporas de este hongo, procedentes del «chafado» de una porción de apotecio, noté la presencia de alguna espora de características muy diferentes a las de las demás. Examinado luego el material de que disponía, encontré en una ramita de la planta matriz (*Lavandula* sp.) una sola periteca correspondiente al género *Leptosphaeria*, cuyas esporas coincidían con las de la gota contaminada. Estas esporas han sido el punto de partida de una serie de cultivos.

Como quiera que la periteca estaba ya abierta, por ser manifiestamente vieja, no pude evitar que los primeros cultivos aparecieran fuertemente contaminados por bacterias. La primera tarea fué, por tanto, la de conseguir el cultivo puro.

Logré un primer paso en la purificación, aislando por medio de mi aparato (J. de Urries, 1945) distintas ascosporas. Estas, sujetas aún a la microaguja, fueron lavadas repetidas veces en agua esterilizada; cosa que conseguí mojan-do el extremo de la microaguja en varias gotas pendientes preparadas en cubres, que iba colocando sucesivamente sobre el anillo de vidrio de la cámara

(1) Véase, de todos modos, lo que dice un poco más adelante.

(2) Véase J. de Urries, 1932.

de aislamiento. En muchas ocasiones las esporas sufrían los sucesivos «lavados» sin soltarse de la aguja. En otros casos la operación se hizo más difícil, pues al desprenderse la espóra, había que tratar de «pescarla» de nuevo, operación no fácil en estas condiciones por efecto de la tensión superficial.

La pureza de los cultivos obtenidos, a partir de esporas así tratadas, no fué absoluta, sin duda porque, a pesar de los repetidos lavados, debió quedar siempre alguna bacteria pegada a su membrana.

El cultivo puro lo conseguí luego sembrando las ascosporas, obtenidas a partir de estos primeros cultivos, en un medio ácido ($Ph = 5$), que impidió el desarrollo bacteriano sin inhibir por completo el crecimiento del hongo.

De estas colonias puras obtuve sucesivos subcultivos.

Los medios de cultivo empleados ya, serán mencionados en la parte experimental de este trabajo.

Para el estudio citológico de la formación de la periteca, utilicé colonias crecidas en agar-extracto de malta (agar 1,5 ‰), preparado a base de «Eumalt líquido» de la firma Andreu Lloberes, calculada (1) para una concentración del 2 al 3 ‰.

Trozos de estas colonias, junto con el agar que las contenía, fueron fijados y tratados ulteriormente hasta su inclusión en parafina.

Los fijadores que empleé, fueron: el alcohol-acético de Carnoy y el picroformol de Bouin, los dos fáciles de preparar en las actuales circunstancias.

Ante el temor de que quedara demasiado duro y frágil el agar, empleé primeramente, como líquido intermediario, el aceite de cedro espeso; pero luego pude comprobar que una estancia moderada en el benzol, no les perjudicaba, y utilicé este líquido, mucho más barato y asequible.

Los cortes obtenidos en serie fueron de 4-10 μ de espesor, según los casos.

Teñí con la hematoxilina férrica (Heidenhain) y también, para estudios anatómicos, con azul algodón.

Los cortes teñidos por este último colorante, los lavé directamente con alcohol de 96°; de este modo evité el desteñido que, inevitablemente, se producía cuando los lavaba en agua o en alcohol de baja graduación. Las preparaciones así tratadas, conservan íntegra su coloración azul después de montadas en bálsamo (2).

Con objeto de preparar ascas íntegras (en los cortes, debido a circunstancias anormales a que luego me referiré, las ascas apoltonadas, rarisimas veces aparecen enteras), procedí del siguiente modo: De una gota de agar, que contiene una suspensión de elementos procedentes del chafado de una periteca, se aísla el asca (o cualquier otro elemento) con ayuda de mi aparato, utilizando, para ello, aguja gruesa (3). Rápidamente se traslada esta asca a un cubre con una pequeña gota de agua. Sobre esta gota se echa el fijador y luego se trata por el método éter celoidina (Hüttig, 1931), con lo que queda en disposición de teñirse (Hematoxilina) y sufrir ulteriores tratamientos.

(1) Según me comunicó el propio Dr. Andreu, su «Eumalt líquido» tiene cosa de un 18 ‰ de agua en relación al extracto seco.

(2) Algunas preparaciones ya llevan cuatro años inalteradas.

(3) La sección de la misma, en su extremo, debe tener un diámetro aproximadamente igual a la longitud del asca.

b) Resultados obtenidos.

Germinación de la espora.—Como primera manifestación, se advierte un proceso de absorción de agua, durante el cual la espora aumenta de volumen distendiendo su membrana por efecto de la presión interna; los tabiques transversales, en cambio, como fácilmente se comprende que sea así, teniendo en cuenta el modo de actuar dicha presión, no aumentan prácticamente de tamaño; esto determina una acusada estrangulación de la espora a nivel de los mismos, y, por tanto, su aspecto queda notablemente modificado.

Como ya llevo observado repetidas veces en otras experiencias de germinación, para que la imbibición protoplásmica se realice, es necesaria la vitalidad de la espora; en el caso de haber perdido la capacidad germinativa, bien por edad o por haber muerto a consecuencia de una temperatura excesiva, etc., no hay tal imbibición.

La salida de los tubos germinativos se consigue por rotura del exosporio mediante una grieta irregular. El proceso comienza normalmente en las células extremas, lo que es comprensible, ya que son las porciones de más reciente formación y con tegumento más delgado; luego las cuatro células de la espora han producido sendos tubos germinativos. Estos son al principio continuos, o con tabiques apenas perceptibles, y con varios núcleos pequeñísimos; luego todas sus células terminan por ser uninucleadas.

El micelio.—La colonia es blanca, ligeramente ocrácea en los cultivos viejos; tiene estructura fibroso-radiada, mejor acusada en los bordes que hacia el centro, donde por entrelazamiento de las hifas se origina un fieltro plectenquimático. Un corte transversal del micelio, dado por el centro de la colonia, permite distinguir (foto 1) los cuatro estratos siguientes, de los que uno corresponde al llamado estrato medio y los otros al estrato profundo de los autores.

De fuera a dentro son:

Estrato primero: El micelio tiene aquí estructura compacta y está constituido por hifas hialinas, de unas 3-4 μ . de anchura, casi desprovistas de contenido protoplásmico, de curso sinuoso y densamente entretejidas, aunque no llegan a constituir una formación cerrada. En caso de haber bacterias, estas forman aquí nódulos, especialmente dentro de ciertas hifas hipertrofiadas.

Estrato segundo: Suele ser el de mayor espesor; la red hifosa es aquí de mallas amplias. Las hifas tienen igual estructura y dimensiones que las del estrato anterior; es decir, pobres en protoplasma, reducido éste a unas bridas que enlazan el núcleo con una estrecha capa contigua a la membrana celular. Como se aprecia en la figura 1, los tabiques transversales de estas hifas están perforados. En ciertas

preparaciones con hematoxilina, ésta tiñe más intensamente la pared del canal y, sobre todo, un anillo que a modo de refuerzo aparece en ambos extremos del mismo. Estos anillos se aprecian, generalmente, en sección óptica, como dos cortos trazos paralelos.

Estrato tercero: En el límite inferior del estrato segundo, el micelio vuelve a hacerse compacto; las hifas que lo constituyen tienen protoplasma denso, con escasas vacuolas, y se tiñen muy bien por los colorantes.

Estrato cuarto: Aquí las hifas tienen curso casi paralelo y orientación perpendicular a la superficie, hundiéndose, sin apenas entrelazarse, en la profundidad del substrato. Estas hifas, más delgadas que las de las capas suprayacentes, muestran un protoplasma abundante y sin vacuolas; los núcleos están esparcidos por todo su curso, y los tabiques son tan tenues que es difícil saber si los artejos son uni o multinucleados. En muchos casos es esto último lo que sucede, sin duda por repetidas divisiones nucleares en un rápido alargamiento del extremo hifal.

La fructificación.—La única forma reproductora aparecida en los cultivos, a pesar de las variadas condiciones en que, durante el curso de las experiencias, han crecido las colonias, ha sido la ascófora. Fuera de ésta, sólo cabe señalar que en el micelio viejo las hifas se estrangulan a nivel de los tabiques y toman aspectos arrosariados, constituyendo así una forma de resistencia capaz de reanudar su actividad y reproducirse cuando se transplantan a un medio reciente (clamidosporas o yemas).

En las preparaciones microscópicas correspondientes a colonias de ocho a diez días de edad, cuando las condiciones del cultivo han sido apropiadas (como se detallará en la parte experimental), empiezan a verse los primeros esbozos de fructificaciones. En la exposición del desarrollo de las mismas, distinguiré las siguientes fases: 1.^a Primeros esbozos. 2.^a Diferenciación del ascogonio. 3.^a Formación de una cavidad. 4.^a Aparición del centro subostiolar y diferenciación de las formaciones secundarias.

1.—*Primeros esbozos (figs. 2 a y 2 b).*

Una hifa cualquiera, generalmente de las situadas en la región limitante entre los dos estratos superiores de la colonia, que en el resto de su curso en nada se diferencia de las demás, se ensancha y su contenido se hace más denso, no presenta vacuolas y se tiñe más intensamente que las células contiguas de la misma hifa; es, también, más corta que éstas, de modo que es probable que haya habido ya alguna división transversal del primitivo artejo. La célula, así diferenciada, se

divide pronto, tanto por tabiques transversales como por otros longitudinales, o más o menos oblicuos. No parece seguirse un orden definitivo en estas segmentaciones. Unas veces he visto que el primer tabique era oblicuo, mientras que en otras (las más) la segmentación transversal ha sido la primeramente aparecida. Como consecuencia de estas tabicaciones, pronto, incluso en esbozos muy jóvenes, resulta una capa de células envolviendo a otra u otras centrales.

2.—*Diferenciación de las células del ascogonio.*

Las células centrales se distinguen de las periféricas por su mejor colorabilidad, tanto de los núcleos como del protoplasma, así como por el mayor tamaño y por el número de sus núcleos.

En algunos casos, mejor que en otros, se advierte una ordenación en espiral de estas células constituyentes del ascogonio.

Es difícil decidir el momento en que comienza la diferenciación del ascogonio. En figuras como la 2.^a, puede interpretarse la célula binucleada, y con una corta expansión, como la célula madre del ascogonio, y hasta el apéndice que presenta, sugiere la idea de un esbozo de tricogino; pero es muy posible que se trate simplemente de una célula que da lugar al nacimiento de una hifa vegetativa, de las muchas que en la fructificación definitiva la relacionan con el resto del micelio. En la figura 3.^a, que corresponde a un esbozo de 20 μ de diámetro, la célula madre del ascogonio, en este caso binucleada (en otros las he encontrado también con varios núcleos), ha dado lugar, por división, a unas cuantas más, igualmente binucleadas, cuando menos las más próximas, que quedan ordenadas según una espiral más o menos patente.

Un estado algo más avanzado, es el reproducido en la figura 4.^a, donde el número de células multinucleadas centrales es mayor, al paso que ha desaparecido la diferencia entre estas células y la primeramente formada o célula madre. Nótese, de paso, la mayor afinidad por la hematoxilina de las células del ascogonio. En las preparaciones en que los núcleos de éste están diferenciados, se han desteñido los de las células de la pared. También es diferente el tamaño de los núcleos, algo mayor en las células del ascogonio.

3.—*Formación de una cavidad y desarrollo de las hifas ascógenas.*

En un estado más avanzado, el esbozo deja de ser macizo, ya que en la región central del mismo los elementos sufren una degeneración probablemente mucilaginoso; se aflojan las relaciones mutuas, y la cavidad que así se constituye aparece surcada por células alargadas y

más o menos deformadas que han perdido su colorabilidad. En algunos casos, como el representado en la figura 5.^a, no se ven ya trazas del ascogonio; en cambio, destacan del resto por su afinidad para los colorantes, los extremos de hifas ascógenas con núcleos manifiestamente más gruesos que los de las células de la corteza, alguna de las cuales tienen dos núcleos también, que deben interpretarse como el resultado de una división nuclear, sin que haya tenido aún lugar la división celular subsiguiente.

4.—*Aparición del centro subostiolar* (figs. 10, 12 y 13), (fotos 3 y 4).

No ha terminado la degeneración de las células centrales del esbozo (en primordios de unas 50-60 μ) cuando tiene lugar en el mismo la aparición de lo que voy a llamar «centro subostiolar».

Desde el momento en que aparece este centro, la multiplicación y diferenciación celular está dirigida y ordenada por él. En ese punto la actividad celular es más intensa, sus células tienen un contenido más denso y se tiñen más intensamente por los colorantes (hematoxilina, azul algodón) que el resto.

Este centro ordenador tiene posición superficial, ya que está cubierto por las capas más externas del esbozo. La división celular es allí más activa y está principalmente orientada en dirección radial. Al mismo tiempo que se dividen, experimentan estas células un alargamiento en sentido centrípeto, y en su movimiento de avance van invadiendo la cavidad del esbozo, rechazando delante de ellas los restos celulares que se oponen a su paso. La actividad va disminuyendo gradualmente a uno y otro lado del citado centro; las divisiones se orientan allí en dirección tangencial, y no hay alargamiento celular.

En virtud de este proceso, resulta una formación compuesta de elementos alargados, ordenados más o menos paralelamente, y que ocupa la porción central, el «núcleo», producto directo de la actividad del centro subostiolar, y una corteza formada por la primitiva corteza de esbozo, que ha ido creciendo en superficie en virtud de la proliferación celular a los lados del centro subostiolar.

Mientras las células de la corteza permanecen unidas entre sí, los elementos del «núcleo», desde un principio separados unos de otros, se van estrechando en su continuo alargamiento, y por los huecos que dejan, avanzan las ascas en sentido ascendente (1). Esta interposición

(1) Obsérvese que la palabra «ascendente» no es apropiada, sentido «centrípeto» lo sería más, ya que sólo por pura convención se considera el poro colocado en la parte superior de la periteca. En realidad, muchas veces (caso de peritecas hipófilas) el poro está colocado en la parte más baja de la periteca, aunque sea la más próxima a la superficie. Lo mismo podría decirse de la expresión «vertical» aplicada en estas descripciones.

de las ascas y su ensanchamiento, lleva consigo un aumento de volumen del conceptáculo, lo que determina una presión sobre las células de la corteza, y por esta causa aparecen más o menos comprimidas. Mientras continúa este crecimiento, las células de la corteza endurecen su membrana, proceso que avanza desde la base al ápice; por eso suelen tener membrana algo endurecida y pardusca muchas células corticales, cuando las próximas al centro de actividad y por tanto más jóvenes, aún son hialinas y de pared delgada.

Queda aún por describir otro producto de la actividad del centro ordenador; me refiero a la formación del ostiolo.

Cuando ya la fructificación muestra una capa de células corticales bien diferenciada y más o menos oscurecida, sobreviene un alargamiento hacia afuera, y probablemente también una proliferación de las células del citado centro subostiolar; este alargamiento determina una elevación a modo de pústula en la corteza suprayacente, y finalmente su ruptura (fig. 11), según un poro más o menos circular. La porción de corteza así elevada constituye la pared del ostiolo. Las células alargadas semejan perifisos.

Una vez logrado esto, toda esta formación secundaria se gelifica y fragua en su lugar el canal ostiolar.

Hasta aquí llevo descrito un caso que en mis preparaciones ha resultado excepcional. En la mayoría de las fructificaciones, sin embargo, no se ha formado un sólo centro subostiolar, sino dos o tres (fotos 5-12), y aún más; hasta seis he contado alguna vez. La aparición de estos centros en unos casos ha sido más o menos simultánea, pero he encontrado también algunos que comienzan a proliferar cuando la fructificación tiene ya varios ostiolos formados e incluso ascas con esporas (foto 8). Todo esto complica sobremanera la estructura de la fructificación; los distintos sistemas de fibras nacidas en los diferentes centros, interfieren en su avance, se comprimen y desordenan. Aumenta la dificultad de interpretar estas figuras, la circunstancia de no poder orientar los cortes a voluntad; el eje o los ejes de tales fructificaciones tienen una orientación independiente por completo de sus relaciones con la superficie del substrato; de ese modo, sólo por casualidad se consiguen cortes meridianos, y aun en ese caso, suelen encontrarse dentro de la misma fructificación elementos de otros sistemas de fibras cortados de través o más o menos oblicuamente (fig. 13, foto 13).

Las ascas.—Desde que aparecen las hifas ascógenas en las fructificaciones aún muy jóvenes, hasta que se inicia la formación del asca, no he conseguido seguirles la pista; las figuras son tan confusas en la base de los conceptáculos por las causas antes especificadas, que hacen imposible formar un juicio seguro. Pero de lo que me he podido asegurar, es que al comenzar la formación de las ascas, las hifas ascógenas

han perdido su condición de hifas independientes. Las preparaciones hechas disociando fructificaciones en ese estado de desarrollo, demuestran que entonces las ascas jóvenes y la base de las fibras están unidas como formando parte de un tejido parenquimático común en la base del conceptáculo. Es muy posible, por tanto, que tal tejido sea, en realidad, un pseudo-parenquima, originado por la tabicación de las hifas ascógenas y su íntimo entrelazamiento con los extremos inferiores de las fibras.

La figura 7.^a c muestra estas íntimas relaciones existentes entre las células de la base del conceptáculo, las fibras verticales y las ascas jóvenes.

En algún caso he visto terminar una fibra vertical con una célula ensanchada y plurinucleada (fig. 7.^a d) que formaba parte del parenquima basal. Esta figura, de interpretación problemática, recuerda las células sexuales que Arnold dibuja en la base de los parafisos de *Sp. leporina*.

No he encontrado ganchos típicamente conformados en el origen de las ascas, pero algunas figuras, como la reproducida en figura 6.^a, pueden referirse a ellos. No es éste el caso de una hifa libre que se encorva en su extremo, formando un gancho. Aquí ocurre que una célula, que parece formar parte del pseudoparenquima basal, se estira algo y produce un apéndice lateral; éste recibe uno de los núcleos resultantes, sin duda (de todos modos no he encontrado una figura en tal estado), de la división conjugada que debió tener lugar anteriormente. Tal apéndice, como ocurre con el extremo de los ganchos, se fusiona con la célula basal del asca, que así resulta también binucleada.

Una vez esbozada el asca, rápidamente tiene lugar la fusión nuclear en su interior (son raras las ascas que aparecen en la preparación con dos núcleos), y el núcleo diploide fácilmente destaca de los demás por su tamaño.

Seguidamente el asca inicia su alargamiento, proceso este que debe ser muy rápido, a juzgar por la escasez de estados intermedios; una vez terminado, el asca pasa por una fase de reposo. En las preparaciones con ascas jóvenes, llama la atención el gran número de éstas, que han alcanzado su longitud máxima y siguen uninucleadas. En esta fase destacan por su colorabilidad del resto de los elementos del conceptáculo; su núcleo se ha agrandado considerablemente (unas 3,5 μ diám.), ha perdido su homogeneidad (1), y muestra un retículo más o menos coloreable, según los casos, y siempre un grueso nucleolo en posición

(1) He de advertir que, dadas las escasas dimensiones de los núcleos en la mayor parte de las células del hongo, no revelable con mis objetivos a seco, y sin disponer de otros de inmersión al agua, la diferenciación hubo de hacerse «a ojo», y no pretendí con ello sino diferenciar núcleos y protoplasma.

excéntrica. La membrana nuclear es difícil de diferenciar de la capa protoplásmica que linda con el núcleo (figs. 7.^a *a* y 7.^a *b*).

Una vez iniciadas las divisiones nucleares dentro del ascas, deben éstas proseguirse rápidamente. No sólo debe ser rápida la sucesión de las tres primeras divisiones, de las que habrán de resultar los primeros núcleos de las ocho esporas, sino también una cuarta. En efecto; entre tantas preparaciones examinadas, sólo por rarísima excepción he encontrado ascas con más de un núcleo y menos de 16, o con núcleos en proceso de división. En cambio, son relativamente frecuentes en los cortes las ascas con ocho pares de núcleos dentro de un contenido protoplásmico en el que no se aprecia solución de continuidad (figs. 8.^a *a* y 8.^a *b*). Así, pues, incluso antes de fraccionarse el contenido del ascas en ocho esbozos de esporas, los ocho núcleos ya han sufrido una nueva división. Raras veces se ven esporas jóvenes ya delimitadas, binucleadas y unicelulares; lo más frecuente es que estas esporas binucleadas sean también bicelulares.

Las esporas jóvenes así formadas, crecen, y también sus núcleos aumentan de tamaño; a la membrana protoplásmica se va añadiendo un exosporio consistente, que adquiere ligero color pardo amarillento. Ascas con esporas amarillentas, bicelulares y binucleadas, son muy frecuentes en las preparaciones, y deben corresponder a un período de cierto reposo en su desarrollo (figs. 9.^a *c* y 9.^a *d*).

La última división nuclear en la espora va acompañada de un ligero alargamiento. Rodeadas como estaban las esporas bicelulares por un exosporio relativamente consistente, éste debe experimentar, en los extremos de las mismas, una relajación de su estructura, modificación que se revela por un color más claro de la membrana en dichos puntos.

Una vez constituida la espora cuadrícélular, crece algo en anchura, al paso que su exosporio termina su «esclerificación» y oscurecimiento, y cubre su superficie de pequeñas granulaciones densamente esparcidas (figs. 9.^a *g* y 9.^a *h*). También prosiguen su esclerificación y oscurecimiento los tabiques transversales, proceso que avanza de fuera a dentro y, por eso, en ese estado, recuerdan los aros de un tonel (figs. 9.^a *e* y 9.^a *f*).

7.—*Descripción de la fructificación madura.*

Fructificaciones globosas, de 130 hasta 260 micras de diámetro; estas dimensiones, de todos modos, varían mucho según el número de conceptáculos desarrollados en su interior: Ostiolo muy diversamente desarrollado; unas veces es corto y papilar, de unas 60 × 50 micras; otras veces es largo, a modo de sifón o pico, hasta de unas 140 micras de longitud. Este ostiolo en la madurez se abre por un poro más o menos circular. Pared coriáceo-membranosa, de unas 20 μ de espesor,

con estructura parenquimática, constituida por dos o tres capas de células exteriores, comprimidas, casi tabulares, de 10-12 μ de anchura vistas de frente, y unas $9 \times 3-4,5 \mu$ en sección, con membrana espesada y coloreada de pardo; espesamiento y color que aumenta hacia el exterior, de tal modo que la cara externa de la capa de células más superficiales es la que está más espesada; hacia el interior, estas capas de células coloreadas y casi vacías se continúan con otras de células algo más isodiamétricas (menos comprimidas), de contenido protoplásmico abundante y membrana hialina y delgada. Ascas numerosas, claviformes, estrechadas en pedicelo más bien corto y nudoso en su extremo; de pared relativamente delgada, de $60-70 \times 10-12 \mu$. Esporas en número de ocho, de ordenación subdística, oblongo-fusoideas de $12-13 \times 4-5 \mu$, con tres tabiques transversales, poco estrechadas en general a nivel de los mismos, con una de las células centrales, por lo regular algo más gruesa que su simétrica; exosporio pardo oscuro, provisto de diminutas verrugas, densamente esparcidas por toda la superficie. Fibras parafisoides tabicadas, ramificadas, de 1,5-2 μ de anchura.

C) COMENTARIO.

El resultado de este estudio suministra motivo para múltiples conclusiones y sugerencias, que trataré de resumir.

Un ostiolo tan bien desarrollado como tiene la especie que me ocupa, no corresponde a formas Pseudosferiáceas, tal como Petrak (loc. cit.) las concibe; no se trata aquí de una papila que se rompe en el curso del desarrollo y deja en su lugar un poro plano «atípico». Por la configuración del ostiolo, así como por las características de sus «parafisos» (1) y abundancia de ascas, esta especie corresponde a su cuarto y último «Entwicklungsstufe» o a una combinación del tercero y cuarto. En la terminología que emplea sería éste un típico Esferiáceo.

La especie estudiada ha mostrado su naturaleza Ascocelular (Pseudosferial); la soldadura de las fibras intertecales a la parte superior de la fructificación así la delatan.

De las dos modalidades que Gäumann (1940) distingue en cuanto al origen de las fructificaciones, *Leptosphaeria Cavanillesii* pertenece al «Pleospora-Typus», ya que aquéllas se originan por división de una sola célula inicial. El tejido que así se constituye es un auténtico parenquima y no un pseudoparenquima, término éste con el que no es raro designar, tratándose de hongos, todo tejido de tal apariencia, sin conocer en muchos casos su origen y, por tanto, con notoria impropiedad a veces.

(1) En la acepción Petrak.

La única representación de órganos sexuales se reduce en esta especie a una serie de células algo diferentes de las restantes por su tamaño, colorabilidad y núcleos, y que apenas dejan entrever su ordenación en espiral. Tales células las tengo por elementos de un ascogonio reducido.

Esta reducción de los procesos sexuales es un hecho que se ha comprobado en muy diversos grupos de Ascomicetos e independientemente de sus relaciones de afinidad. Sin pretender hacer una recopilación de los muchos datos, a veces contradictorios (explicables por las dificultades técnicas de esta clase de estudios), acumulados en el curso de los últimos años, haré, sí, mención de algunos de ellos, que aclararán la posición de la especie estudiada por mí dentro del panorama variadísimo que ofrece el comportamiento sexual de los Ascomicetos.

Mycosphaerella tulipiferae (Schw.) Higg. (Higgins, 1936) forma un ascogonio que se fusiona con células libres, espermacios o microconidios (1).

Endostigme inaequalis (Cke.) Syd. (Killian, 1917) desarrolla un ascogonio cuyo tricogino se fusiona con un anteridio.

Entre las formas apándricas puede haber:

Fusión entre dos células del ascogonio; estos casos de partenogamia se conocen en *Capnodium salicinum* Mont., en que (2) las cosas ocurren como en *Systema Ulmi* (Schleich) Th. Syd. (Killian, 1920).

O puede haber autogamia al desarrollar las células del ascogonio hifas ascógenas sin previa fusión. Este es el tipo a que adscribo la especie estudiada por mí.

Una mayor reducción es la que ofrecen formas, como varias especies de *Sporormia* (Arnold, 1928), (Dangeard, 1907), en que no se desarrolla órgano sexual alguno.

Un panorama tan variado ofrecen los Esferiales o cualquier otro grupo de Ascohimiales, algunas de cuyas especies (*Neurospora*, *Pyronema*) han sido tema de numerosas investigaciones y controversias (Moreau, Morouzi, Dodge, etc.) (3); y es que dentro de un mismo género, o aún de una misma especie, las manifestaciones de la sexualidad pueden variar mucho, según las «cepas».

Sólo en la especie *Neurospora sitophila* (Mont) Shear et Dodge (1927), a la que podría calificarse como la *Drosophila* de los Ascomicetos, tengo noticias de las siguientes modalidades a este respecto:

(1) No entro en la discusión entablada, en este caso y en otros análogos, acerca de si dichas células son espermacios o microconidios que los substituyen en sus funciones.

(2) Según dato que tomo de Gäumann (1940).

(3) Con este motivo ha vuelto a resucitar la vieja controversia entre las ideas de Harper y las de Dangeard (sexualidades «Harperiana» y «Dangeardiana», según la expresión de Moreau), cuya exposición puede verse en muchos libros de micología.

Fusión entre células del ascogonio y microconidios.

Fusión entre células del ascogonio y macroconidios.

Fusión entre células del ascogonio e hifas vegetativas.

Fusión entre hifas vegetativas.

Como llevo indicado en la parte descriptiva, la ascogénesis en *L. Cavanillesii* no puede referirse sin más al «tipo Pyronema»; los ganchos, si existen, no son los típicos. Esto representaría, en ese caso, una excepción entre los Pseudosferiáceos, ya que todos los estudiados hasta ahora parecen tener hifas ascógenas de tipo Pyronema.

Veamos, a continuación, qué es lo que ha ofrecido el estudio de esta especie en relación con la cuestión de los parafisos.

Arnold (loc. cit.), en el estudio que hace del desarrollo de la periteca en *Sporormia leporina* Niessl., describe el proceso de modo bien distinto de lo que ocurre en otros casos. En él expone el crecimiento de los parafisoides de un modo que tiene ciertas coincidencias con lo que yo he encontrado en *L. Cavanillesii*. No tengo noticia de que se haya vuelto a estudiar el caso, ni para confirmarlo ni para rebatirlo; pero es extraño que Gäumann (loc. cit.) reproduzca la figura 18 del trabajo de Arnold para darle una interpretación diferente, en realidad opuesta, a la de este autor. Según Arnold, los extremos inferiores de las hifas verticales avanzan libremente en su movimiento descendente. Gäumann, en cambio, presenta el caso como ejemplo de rotura precoz de las conexiones existentes entre la base del conceptáculo y la pared de la fructificación.

En relación con el trabajo de Arnold, añadiré que, si bien en el caso estudiado por mí no hay fases que se parezcan a las que él representa en sus figuras 7.^a y 8.^a, he encontrado alguna en mis preparaciones que puede compararse con la de las células anchas binucleadas en los extremos libres de las hifas descendentes, representadas en sus figuras 9.^a, 10 y 11 (1).

Por lo demás, el desarrollo en otras especies del mismo género *Sporormia*, tal como *S. intermedia* Auersw. (Dangeard, 1907), no sigue la marcha que Arnold expone para el caso de *S. leporina* en el trabajo que comento.

Bessey (loc. cit.), hablando de los Pseudoferiales, dice:

«The asci arise from ascogenous hyphae in the midst of a more or less pseudoparenchymatous stromatic tissue and gradually by pressure aided perhaps by solution of the tissues, make cavities within which each ascus lies alone, separated from the next ascus by a thicker or thinner remnant of the original stromatic tissue».

(1) Nótese, por otra parte, cómo recuerdan, en cierto modo, a los ascogonios de algunas *Mycosphaerella*.

Poco más o menos, desde los tiempos del establecimiento de los Pseudosferiáceos por V. Höhnelt, se viene repitiendo con rara uniformidad esta descripción del desarrollo de las fibras parafisoides. Según ella, en medio de un tejido celular compacto crecen las ascas, y en su movimiento de avance van abriéndose camino mecánicamente (en el texto arriba trasladado se admite también la cooperación de una gelificación), en un trabajo que yo comparo al de la quilla de un original rompehielos. No es extraño, pues, que Nannfeldt (loc. cit.), comentando la condición crasitunicada de las ascas en las formas ascoloculares, diga: Se comprende que las ascas sean gruesas en los Ascoloculares cuando se piensa que han de abrirse paso desalojando el tejido que las incluye.

Otras veces (Petraik, p. ej.), se considera el adelgazamiento de las fibras verticales como un resultado de la compresión ejercida por las ascas sobre las células del tejido intertecal.

En *L. Cavanillesii* las cosas ocurren de diferente manera, en cierto modo opuesto a lo que se viene describiendo para otras especies (1). Las ascas no abren su camino en el proceso de su crecimiento, sino que avanzan por el camino que encuentran abierto entre las fibras parafisoides. Mucho antes de que las ascas se inicien (fotos 3, 4 y 5), las fibras parafisoides están individualizadas, y esta separación entre tales elementos, se puede observar, en fructificaciones maduras, en la porción superior del conceptáculo, debajo del ostiolo, a donde no llegan ni llegarán (puesto que han alcanzado su completo desarrollo) las ascas. En esa región tales fibras son tan delgadas como lo puedan ser en proporciones situadas más cerca de la base, sin haber necesitado para su adelgazamiento de la compresión de las ascas.

Si, pues, no es mecánica la causa de la resolución del tejido del conceptáculo en fibras parafisoides, podría pensarse en una gelificación, idea apuntada como causa más o menos decisiva en el párrafo anterior de Bessey, o por Gäumann en otro a que me referiré más adelante.

Miller y Dodge son autores de sendos trabajos en que se ocupan, respectivamente, de *Leptosphaeria Doliolum* (Pers.) Wint. y *L. opuntiae* Dodge; no he podido leer tales publicaciones (2), pero del resumen que hace Gäumann (loc. cit.) de los mismos, resulta que el desarrollo de las fructificaciones se verifica en estas especies con arreglo al siguiente esquema: «Por mayor crecimiento de los tejidos estromáticos periféricos que forman la pared, resulta estirado hacia arriba el tejido funda-

(1) Hago la aclaración (por otra parte innecesaria) de que mi crítica de lo expuesto por otros autores, se refiere a la relación que guarda con lo observado por mí, sin poner en juicio, en modo alguno, las observaciones de tales autores en otras especies.

(2) Sin embargo, a la amabilidad de estos autores, debo el conocer otras de sus publicaciones.

mental del centro; éste se divide intercaladamente, se estratifica paralelamente y resuelve poco a poco en numerosos cordones a modo de urdimbre de un telar (parafisoides), que al pronto aún se continúan con el tejido fundamental en la base y en el ápice, pero más tarde sueltan sus conexiones con el tejido fundamental de la base y cuelgan entonces de la parte superior, mientras desde abajo empiezan a ascender entre ellos las ascas en su crecimiento».

Es muy especial la disolución de la membrana celular que los autores admiten en la formación de las fibras parafisoides, según parece desprenderse de los párrafos transcritos. En el poliedro que constituye cada una de las células del tejido fundamental, tal proceso de gelificación habrá de afectar a todas sus caras, excepto a dos; las que habrían de resultar tabiques transversales superior e inferior de cada artejo de las hifas parafisoides. La distribución de la encima o encimas que intervengan en tal transformación, habrá de estar perfectamente polarizada dentro de cada célula, ya que, de resultas de la misma, casi todas sus facetas se disolverán (1), en tanto que dos de ellas quedarán tan inalteradas, que incluso podrán sufrir la tracción vertical a que se refiere Gäumann (precisamente actuando en dirección perpendicular a su superficie), sin desprenderse.

Todas estas interpretaciones, a mi modo de ver, consideran a las células como figuras plásticas inertes (por tracción se estiran y por compresión se adelgazan), sin atender a que, como elementos vivos que son, se pueden alargar y adelgazar sin que se precise acción mecánica externa que actúe sobre ellas. En el caso estudiado por mí, las fibras tantas veces mencionadas están individualizadas desde el comienzo (fotos 3 y 4) y se alargan y adelgazan con el tiempo sin tracción ni compresión que las obligue, incluso en contra de ciertas presiones que puedan actuar sobre ellas.

En los casos, tan frecuentes en mis cultivos, de fructificaciones con varios ostíolos (varios conceptáculos por tanto), las fibras han tenido que alargarse sin estar adheridas a la corteza más que por un extremo, y en esas condiciones, mal han podido tirar de ellas (foto 5). En tales circunstancias, en vez de esfuerzo de tracción, más bien habría que hablar de esfuerzo de comprensión en esa misma dirección, ejercido mutuamente por dos conceptáculos opuestamente orientados cuando crecen dentro de una misma fructificación (fotos 6 y 10). Lo mismo ocurre en la formación del ostíolo; las células parenquimáticas situadas encima del centro subostiolar se alargan y adelgazan (hasta semejar perifisos), venciendo la resistencia que les oponen las células exteriores

(1) En realidad el plano medio de las membranas celulares.

endurecidas, y a las que en su movimiento de avance levantan y terminan por romper.

El conceptáculo y sus elementos alargados se desarrollan, pues, desde un principio, sin conexión con el tejido cortical de la base. Esto es obvio en los repetidos casos en que se han desarrollado dos conceptáculos en polos opuestos de una misma fructificación, y con la misma o mayor razón se hace evidente en el caso de que sean más de dos los conceptáculos dentro de la misma.

Esto no supone necesariamente que las fibras crezcan con extremos libres en su avance basípeto. Es difícil seguir el curso de tales elementos debido a su gran número y también a no estar contenidos en un plano en todo su recorrido. En algunos casos se puede apreciar en la base del conceptáculo, aun en vías de crecimiento, un tejido parenquimático, o más probablemente un pseudoparenquima originado por el entrelazamiento y soldadura de los extremos de las hifas.

Comenzada la proliferación y alargamiento de las células de la corteza situadas debajo del centro subostiolar, las fibras en su crecimiento van rechazando hacia la base (como se aprecia en dos de los tres sistemas de fibras de la foto 5) los restos celulares que ocupaban el centro del esbozo, según ya se explicó. Estos restos de células medio gelificadas, estiradas y deformadas, son los únicos lazos de unión entre la base del conceptáculo y la porción basal de la corteza, en el caso de desarrollarse uno solo de éstos por fructificación.

En las fructificaciones de esta *Leptosphaeria* hay posibilidad de distinguir dos elementos de origen distinto, a saber: uno o varios conceptáculos y un estroma cortical. Aunque la naturaleza de los hechos no sea del todo comparable, también ocurre esto en otros Ascomicetos e incluso en muchos Esferiales tenidos hasta hace poco como «no estromáticos», según demostró Miller, entre otros casos, en *Rosellinia* (1928 b). Yo también, en trabajos anteriores, he descrito algunos casos de fructificaciones con pared de origen mixto en ascoloculares, como *Unamunoa verrucosa* (J. de Urríes, 1942) e *Hysterium lavandulae* (J. de Urríes, 1941).

El conceptáculo o periteca aparece, por tanto, como una formación secundaria, nacida en el estroma primitivo del esbozo por la actividad del centro ordenador subostiolar. El estroma o formación primaria queda así reducido, en este caso, a la envuelta cortical de la fructificación.

Sin pretender generalizar lo observado por mí, por no saber siquiera si es aplicable a otras especies de éste u otros géneros, me interesa hacer resaltar una diferencia, que a mí me parece esencial, entre las formas que se tienen por Pseudosferiales primitivos (Dothioráceos) y *L. Cavallinesii*. Tal diferencia la determina la aparición de lo que he

llamado «centro subostiolar». En los Dothioráceos las ascas crecen en el tejido primario (estroma); en *L. Cavanillesii* se desarrolla una formación secundaria que reemplaza al estroma en la región central de la fructificación y que, al estar constituida por fibras, crea las condiciones anatómicas que facilitan el avance de las ascas. De estas ascas, sólo con un criterio muy amplio puede decirse que estén incluidas en «lóculos uniasciferos» en cualquier momento.

Terminaré este capítulo haciendo un comentario de la posible significación del centro subostiolar. Tengo a tal centro por un punto meristemático, en virtud de cuya actividad al tejido primario del estroma, hasta entonces indiferenciado, se agregan formaciones secundarias que se orientan en relación con la posición de aquél. Por encima del mismo (hacia afuera) se diferencia el ostiolo. Por debajo (hacia adentro) crecen las fibras del conceptáculo, lo que motiva que las hifas ascógenas, que surcaban en distintas direcciones la porción central del esbozo en vías de degeneración, sean rechazadas hacia la base, y así las ascas habrán de crecer luego en sentido porípeto (ascendente). Finalmente, por multiplicación tangencial de las células marginales del mismo, se agranda la superficie del estroma cortical.

Se podría creer en la existencia de un «organizador» análogo a los que se conocen con este nombre en la fisiología del desarrollo; pero falta toda experiencia en este sentido. Con todo, las anomalías en el desarrollo de las fructificaciones, provocadas por las condiciones del cultivo «*in vitro*», valen, en cierto modo, por experiencias de trasplante.

Cuando, en vez de uno solo, se originan varios centros subostiolares en distintos puntos de la superficie del esbozo (probablemente por acción difusa de un estímulo que en condiciones normales actúa unilateralmente), las células del estroma próximas a tales centros anormales («estroma cortical presuntivo») experimentan una diferenciación (alargamiento en un determinado sentido y proliferación) disconforme con su significado prospectivo. Muchas de estas células que contribuyen a formar ostiolos, fibras, etc., en condiciones «normales» (un solo centro) hubieran formado parte del parenquima cortical.

2) PARTE EXPERIMENTAL

A) GERMINACIÓN DE LAS ESPORAS

1. *Temperatura*.—Entre las temperaturas ensayadas, la de 20° es la óptima, tanto por la velocidad con que se desarrolla el proceso, como por el número de esporas germinadas. A esta temperatura llegan a germinar prácticamente el cien por cien.

Es de notar una ligera desviación de la curva hacia las bajas tempe-

raturas, y, sobre todo, la rapidez en la germinación, si se compara con lo que sucede con otras esporas de tegumentos pardos, y aun muchas hialinas. Incluso a la temperatura de 4-5°, bastan 14 horas para que se inicie la formación del tubo germinativo.

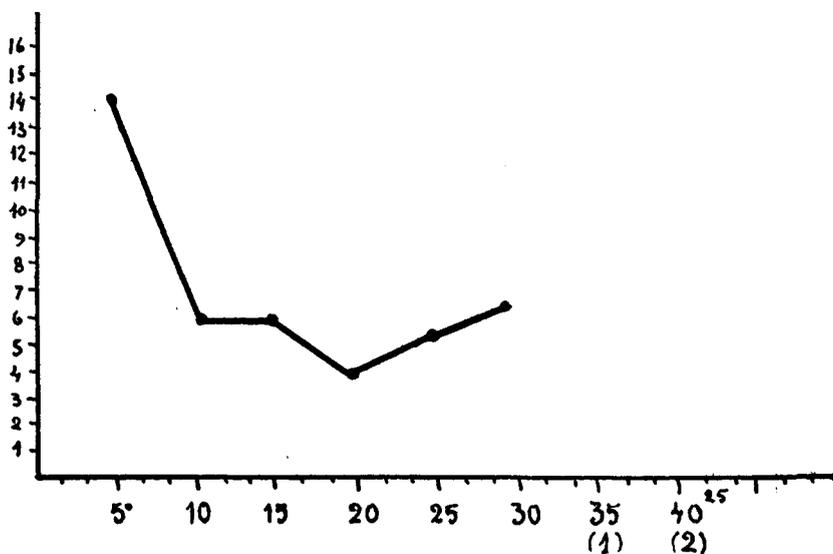
En temperaturas comprendidas entre 10 y 30°, son escasas las diferencias observadas. A 35°, es aún posible la imbibición protoplásmica, pero no la germinación, es decir, la formación de la hifa germinativa. Si esporas en tal estado son trasladadas a un lugar de temperatura más baja, inmediatamente comienzan a germinar.

A continuación reproduzco, a modo de ejemplo, el protocolo de una de las experiencias de germinación (día 18-I-46). Las esporas fueron puestas en agua bidestilada (en el fondo de placas Petri de pequeño diámetro) a las once de la mañana.

Temperaturas	Hinchadas (%)	Umbral de germinación (tubos de menos longitud que la espora) (%)	Tubos por lo menos de igual longitud que la espora (%)
30°	50	10	0
20°	95	—	50
10°	50	5-10	0

Observación hecha a las cinco de la tarde.

Los resultados obtenidos en la germinación de esta especie de *Leptosphaeria*, vienen expresados gráficamente así:



(1) Imbibición posible.

(2) Mueren.

2. *Iluminación.*—En todas las experiencias dispuestas con este objeto, los cultivos fueron distribuidos en tres lotes. Uno de ellos quedó expuesto a las alternativas naturales de día y noche. Otro se mantuvo constantemente en la oscuridad, envuelto en un paño negro. El tercero recibió iluminación ininterrumpida, sirviéndome para ello de lámparas eléctricas colocadas delante de las estufas con puerta de cristal.

En ningún caso la germinación de las esporas resultó afectada por las condiciones de iluminación, lo mismo en lo que se refiere a su morfología que al porcentaje de germinaciones o a los tiempos invertidos en ella.

3. *Composición química del medio.*—Las esporas de esta especie han germinado en todos los medios ensayados: agua corriente; agua destilada, extracto de malta con agar o sin él, agar-patata, agar-sintético, etc. Así mismo ensayé unas mezclas de fosfatos con valores de *Ph*, comprendidos entre cuatro y ocho. En todos estos medios, la velocidad y el porcentaje han sido prácticamente iguales para una misma temperatura.

B) EL MICELIO.

1. *Temperatura.*—Estudí, en relación con esto, las temperaturas 4-6°, 10-13° y 20°. Esta última corresponde a una estufa regulada. Las otras dos son sólo aproximadas. No disponiendo en el laboratorio de dispositivos adecuados que me permitiesen regular esas temperaturas bajas, tuve que servirme de estufas apagadas, y las observaciones fueron hechas en los meses de invierno. Los cultivos a 4-6° los tuve en una habitación siempre sin calefacción; la temperatura de 10-13° se refiere a una estufa apagada colocada en el laboratorio (con calefacción a determinadas horas). Con todo, el termógrafo puesto junto a los cultivos marcó muy poca oscilación (experiencias comenzadas el 8-I-46).

Los resultados obtenidos se resumen así: cultivos en placa Petri con agar-extracto de malta al 3 %.

Crecimiento valorado por el diámetro de la colonia:

Edad	Temperaturas	20 días	30 días	40 días	50 días	60 días
>	4-6°	—	4 mm.	6 mm.	10 mm.	15 mm.
>	10-12°	10 mm.	22 »	30 »	42 »	60 »
>	20°	25 »	40 »	63 »	95 »	(1)

(1) Ha llegado al borde de la placa.

Como el tamaño de la colonia varía también con el del trozo inoculado, advertiré que todos estos datos se refieren a colonias crecidas a partir de una sola espora.

Los valores del crecimiento en los cultivos con temperatura no regulada, deben aceptarse sólo como aproximados; pues, si bien las oscilaciones diurnas fueron muy pequeñas en las condiciones en que se dispuso la experiencia, la temperatura media fué elevándose, y llegó a ser de 7-8° en la estufa más fría, a los 70 días de haber comenzado la experiencia (día 16-III-46).

Según se desprende del cuadro anterior, los diámetros de las colonias crecidas a 20°, tienen aproximadamente valores dobles que los de las mantenidas a 10-12°. Los de estas últimas, en cambio, resultan cuádruples y aun quíntuples de las correspondientes a la temperatura de 4-6°. Hecho este que revela las condiciones precarias en que éstas se han desarrollado.

2. *Iluminación.*—En medio de agar-extracto de malta, la luz provoca la formación de un estrato aéreo lanoso-velutino, formado por hifas blancas (foto 2). Este estrato aparece tanto en los cultivos constantemente iluminados como en los sometidos a la alternativa diurna de luz y oscuridad. Las colonias crecidas en constante oscuridad no desarrollan tales hifas aéreas. Tampoco se forma el estrato aéreo en los cultivos hechos en otros medios distintos del extracto de malta; sea cual fuera su régimen de iluminación, estas colonias nunca crecen por encima del estrato rasante.

3. *Composición del medio.*—En medios líquidos no se desarrolla esta especie.

De todos los medios empleados (agar-extracto de malta, agar-patata, agar-zanahoria, agar-sintético con vitamina B₁ o sin ella), el que ha dado colonias más vigorosas y de crecimiento más rápido, ha sido el agar-extracto de malta. En todos los medios naturales, el desarrollo fué mejor que en los medios sintéticos.

Reacción del medio.—Para estudiar su influencia en el crecimiento del hongo, preparé series duplicadas de placas Petri, unas con un medio sintético (1) adicionado de 1,5 % de agar, y las demás con otro fuertemente amortiguado por una mezcla de fosfatos (2). Estas series

(1) Este medio, que en lo sucesivo designaré abreviadamente por (5), tiene la siguiente composición (Defago, 1940):

Glucosa	2%
Asparaguina	0,1 »
Sulfato magnésico	0,05 »
Fosfato monopotásico.....	0,15 »
Sulfato ferroso.....	trazos.

(2) Este difiere del anterior por tener una mezcla de fosfato monopotásico (M/50) y fosfato disódico (M/50).

comprendían valores de *Ph*, desde 3 hasta 9 (1), obtenidas adicionando al medio gotas de ClH o NaOH n/1. Los resultados, descartando como es natural para estos efectos alguna placa que se contaminó con un *Penicillium*, han sido completamente coincidentes en ambas series. Trasladaré, como ejemplo, una de las observaciones:

<i>Ph.</i>	3	4	5	6	7	8	9
desarrollo de las colonias	no desarrolladas	apenas desarrolladas	20 mm. diám.	60 mm. diám.	75 mm. diám.	50 mm. diám.	apenas prendido

Las placas habían sido inoculadas con trozos aproximadamente iguales de una misma colonia (subcultivos procedente de la colonia monospórica L/61). El medio de cultivo fué: agar (S) con vitamina B₁.

A primera vista parece haber una contradicción entre estos datos y los que se reproducen en otro sitio, con crecimientos más bajos. La diferencia se debe a que las colonias han crecido en un caso a partir de una espora, y en el otro ha sido un trozo de colonia el punto de partida.

Factores de crecimiento.—En los cultivos hechos en medio sintético (S) con agar, no he notado diferencia alguna entre las colonias desarrolladas en medio con vitamina B₁ y las desarrolladas en el mismo medio, pero sin tal vitamina; incluso tratándose de colonias procedentes de siembra monospórica, en la que queda excluido todo suministro extraño de substancia. He notado, sin embargo, una disminución paulatina del crecimiento en los sucesivos subcultivos hechos a partir de estas colonias en medios constantemente privados de vitamina. Pudiera creerse que la falta de ésta era el motivo de tal comportamiento. Para comprobar este extremo, preparé últimamente un grupo de placas con vitamina B₁ y otro grupo paralelo con el mismo medio, pero sin aneurina; las placas fueron sembradas con trozos de una misma colonia degenerada. El resultado ha sido en todas ellas el mismo; el crecimiento ha sido extremadamente lento; a los tres meses, en estufa a 20°, el diámetro de la colonia no pasa de unos 40 mm. (*Ph* = 6).

No es, pues, la falta de aneurina la causa limitante del desarrollo, y debe ser responsable de ello otro u otros factores presentes en el extracto de malta, ya que bastó añadir al medio pequeñísima cantidad de tal extracto para que el crecimiento recuperase sus características normales (foto 17). La insignificante cantidad de tal factor contenida

(1) Determinaciones hechas con tiras de papel universal Merck.

en la espora, debió ser suficiente para permitir el desarrollo normal de la colonia en las primeras siembras (1).

C) LA FRUCTIFICACIÓN.

a) Antecedentes.

Todos los que se han dedicado al cultivo de Ascomicetos, saben por experiencia lo difícil que, en la mayor parte de los casos, resulta el empeño de obtener fructificaciones ascóforas. Tales dificultades no corren paralelas con las exigencias del desarrollo vegetativo; con frecuencia es sumamente fácil conseguir un crecimiento micelar exuberante de especies que se han mostrado hasta el momento incapaces de fructificar en cultivo artificial (2). En otros muchos casos, las fructificaciones obtenidas corresponden únicamente a fases «imperfectas»; fructificaciones éstas que, por lo regular, se logran con mucha mayor facilidad.

Según se desprende de los resultados obtenidos hasta ahora, las condiciones requeridas para la aparición de peritecas en los cultivos artificiales, varían grandemente dentro de especies de un mismo género, aun siendo éstas de un régimen de vida análogo. Se ha dicho que las especies saprofitas fructificaban «*in vitro*» más fácilmente que las parásitas, y se exponen razones para ello. Pero, según demostró Klebahn (1918), dentro del género *Gnomonia* hay especies saprofitas que no fructifican en cultivo artificial; mientras otras, como *G. rosae* Fuck. o *G. leptostyla* Ces. et de Not., aunque parásitas, fructifican rápidamente en esas condiciones. Yo mismo he tenido ocasión de comprobar este comportamiento tan variado dentro del mismo género *Leptosphaeria*. Como veremos, en ciertas condiciones, es sumamente fácil hacer fructificar a *L. Canillensis*; en cambio, en las colonias de otras especies del género no han aparecido más que fructificaciones secundarias, o se ha desarrollado únicamente micelio.

Las célebres experiencias de Klebs (1918), extendidas a los más diversos grupos de hongos por discípulos y continuadores, parecieron demostrar que en el determinismo de la fructificación interviene, en primer término o exclusivamente, un cambio cualitativo de las excitaciones normales (Jost, 1925), siendo, entre todos ellos, el más importante el empobrecimiento o agotamiento del material nutritivo. Estas ideas clásicas han sido modificadas al haberse descubierto la influencia en la fructificación de excitaciones específicas.

En el grupo de los Mucoríneos es donde se ha profundizado más en estos conocimientos. En la segunda década de este siglo se investigaba las relaciones entre formación de cigosporas y temperatura de cultivo, o concentración del medio (Schwartz, 1926), cantidad de oxígeno (Zikes, 1926), contenido en azúcares y sustancias nitrogenadas (Schopfer, 1927), etc.; a partir del año

(1) De todos modos, como ya advertí, el crecimiento en los medios naturales fué siempre mejor.

(2) *Sporormia Pollacei* El., representa el extremo contrario (Elsel, 1930); las mismas células de la ascopora se segmenta y da origen a la periteca.

1930, y muy especialmente por el impulso dado a estos estudios por Schopfer (1), se han sucedido los trabajos que tratan de las relaciones entre formación de cigosporas y factores específicos de la misma.

Exceptuando alguno que otro, como *Pyronema confluens* Tul. (Claussen, 1912; Robinson, 1926; Kerl, 1937), con los Ascomicetos se ha logrado menos en estudios de esta clase. A continuación resumiré los resultados que me han parecido más significativos de entre la multitud de datos esparcidos por tantas publicaciones.

La luz ordinaria es indispensable para la fructificación en *Ascophanus carneus* (P.) Buod. y especies de *Sordaria*; en *Pyronema* (Kerl, loc. cit.), así como en *Hysterographium fraxini* (Pers) D. Not. (Zogg., 1943). En *Plenodomus fuscomaculans*, sólo en ciertas condiciones se hace necesaria (Leonian, 1924); en *Diaporthe Sojae* (Lehmann, 1923) la luz impide la formación de picnidios.

Las radiaciones ultravioletas provocan la formación de peritecas en *Neurosporas*; de otras especies ensayadas resulta que se formaron más peritecas en una *Ceratostomella*, y en cambio este agente impidió la fructificación en *Chaetonium olivaceum* (Stevens, 1930).

Los rayos X provocaron la aparición de peritecas en *Aspergillus fumigatus* Fresen (Sartory y Meyer, 1926); las emanaciones de radio hicieron lo propio (Sartory y Meyer, 1926).

La temperatura ha de estar comprendida entre ciertos límites, y en algún caso ha sido precisa una temperatura variable para que la fructificación se formara (Logg, loc. cit.).

Ciertos elementos catalíticos se han revelado necesarios a tal fin, como en *Acualium nigrum* Joh. et Olg., y en varios casos se conocen las concentraciones mínimas de oxígeno necesarias para la fructificación (Niethammer, 1938, y Denny, 1933, respectivamente).

Es bastante frecuente que tal proceso sea favorecido por la desecación del medio; esto puede ser una de las causas de que, lo mismo que sucede en la naturaleza (fases imperfectas en primavera; fase ascófora en verano y otoño), también en los cultivos se produzcan los ascomas después de los picnidios. Wehmeyer (1926) ve en las dificultades de circulación del agua dentro de los frascos de cultivo, una de las causas más importantes de la falta de fructificación en los mismos.

Relacionado con el desecamiento del medio está el cambio en la concentración del mismo. En algún caso la fructificación se verifica a una concentración extremadamente alta del medio; tal ocurre con *Aspergillus niger* Van Thieg (Bezssonof 1919), que produce peritecas en solución de glucosa al 65 por 100. Pero, en general, las investigaciones relativas a cambio de concentración dieron un resultado de acuerdo con la idea fundamental de Klebs (1898 y 1913); es decir, una detención brusca del crecimiento provoca la for-

(1) En su obra (Schopfer, 1943) puede encontrarse amplia referencia de los trabajos que tratan de los factores vitamínicos que condicionan la reproducción de *Phycomyces* y otros Fícomicetos; a ella remito al lector. En un trabajo posterior, Robbins y Schmitt (1945) demuestran que el pretendido factor F_1 (que en unión de la vitamina B₁ y del factor Z₁ se tenían como necesarios para la formación de cigosporas en *Phycomyces Blakesleanus*) no es una sustancia específica, sino sólo una condición que permite a los micelios (+) y (-) reunirse antes de que el Ph del medio haya alcanzado un valor crítico.

mación de órganos reproductores. Esta detención puede incluso ser debida a causas mecánicas, como un obstáculo que se oponga al avance del micelio, según resulta de las experiencias con *Pyronema* (Robinson, loc. cit.) (1); pero la mayor parte de las observaciones se refieren a un descenso más o menos completo de la concentración nutritiva. En *Pyronema confluens* Tul. (Robinson, loc. cit.) coincide con el agotamiento del alimento nitrogenado. En *Valsa leucostoma* (Pers.) Fr., Leonian (1923) provocó la formación de peritecas, cambiando el cultivo a un medio más diluido; si el cambio es en sentido contrario, lo que se producen son picnidios. A análogas conclusiones llegan Hawker y Chaudhuri (1946) con varios ascomicetos. También está conforme con las ideas de Klebs, el resultado obtenido por Brefeld con *Ascoidea rubescens* Bref. *Pleodomus fuscomaculans* representa un caso extremo, ya que fructifica (picnidios) incluso en agua destilada (Coons, 1916). *Erysiphe galeopsidis* D. C., según las experiencias de Laibach (1930), entra también en este grupo.

Muy curioso es el comportamiento de una *Mycosphaerella* (Grossenbacher, 1909), que inoculada en *Cucurbita pepo* L., produce peritecas; pero si se inocula en otras Cucurbitáceas, sólo produce picnidios. Análogo comportamiento tiene el ya citado *E. Galeopsidis*, que puede vivir en varias especies de *Lamium*, y sólo en *L. album* L. forma peritecas.

Otro grupo de experiencias y observaciones se refieren a vitaminas y hormonas como factores de la fructificación: acción de la adrenalina en *Neurospora* (Moreau, 1938 a); vitamina B₁ y Biotina en *Melanospora destruens* (Hawker, 1938); vitamina B₁ y Auxinas en *Pyronema* (Kerl. loc. cit.). Quizás deban entrar aquí algunos de los casos conocidos de fructificación provocada por la presencia de bacterias, según refieren: Sartory (1916) de una especie de *Aspergillus*, Molliard (1903) de *Ascobolus furfuraceus* Pers. y Das Gupta (1938) de *Rosellinia*.

Lugar aparte merecen (por seguir orientación bien distinta de las anteriores) los trabajos que se refieren al estudio de las posibilidades de producción de ascomas en los micelios monospóricos y en sus combinaciones binarias.

Entre los primeros trabajos que se ocupan preferentemente de esta cuestión, está el de Edgerton (1914). Cultivando al mismo tiempo un micelio de los que designó con (+) y otro designado con (—), obtuvo fructificaciones en la línea de contacto de las colonias. Kirby (1923) demostró la heterotalia de *O. Cariceti* (B. et Br.) Sacc. Dodge, ya en 1920, publicó un caso de heterotalia; pero el punto de partida de numerosas investigaciones lo marca el que publicó en colaboración con Shear (Shear and Dodge, 1927), relativo a la heterotalia en *Neurospora sitophila* Shear et Dodge. Luego se han sucedido sin interrupción las comunicaciones referentes a casos de heterotalia o de homotalia en los Ascomicetos.

La primera interpretación de estos fenómenos atribuía a los micelios signos sexuales opuestos; pero luego se ha comprobado la existencia de ascogonios en todos los micelios, tanto en los calificados como (+) como en los

(1) Cultivando diversos ascomicetos, yo también he tenido ocasión de observar, en algunos casos, una fructificación (picnidios) más abundante en la región inmediata a las paredes del recipiente.

designados como (+-). El análisis genético ha demostrado en las especies mejor conocidas a este respecto la existencia de un par de factores de esterilidad, en los que deben diferir los micelios para que la producción de peritecas se realice, siendo aptos para funcionar tanto los órganos masculinos como los femeninos (Ames, 1932 y Zickler, 1937).

En la mayor parte de los Ascomicetos heterotálicos no hay, por tanto, una determinación sexual haplogenotípica propiamente dicha, sino que se trata de una monoecia combinada con autoesterilidad.

Se conocen, sin embargo, algunos casos de auténtica determinación haplogenotípica del sexo con intervención de realizadores sexuales, que se heredan independientemente de los factores de esterilidad. Esto ocurre en *Bombardia lunata* Zick, así como en *Glomerella lycopersici* Kruger (Hüttig, 1935).

Las especies homotálicas, en la mayor parte de los casos han revelado poseer simultáneamente los dos realizadores de valencia aproximadamente igual. Se conocen también casos de micohaplontos (*Neurospora tetrasperma* Shear et Dodge). Experimentalmente se han conseguido formas que corresponden a los hermafroditas primarios de Correns (1928), es decir sin realizadores sexuales [*Sordaria fimicola* (Rhb.) Ces. et Not.] (Greis, 1941).

De todos modos, las cosas son en ocasiones más complicadas. Por ejemplo: se han referido casos en que los dos tipos de micelio (+) y (-) han crecido juntos sin fructificar; otras veces ha ocurrido lo contrario (Moreau y Moruzi, 1931 y 1932; Moruzi, 1932); sin haberse puesto en contacto los dos micelios, se han producido ascomas. Apoyándose en casos como los últimamente citados, se ha pretendido negar significación sexual a los procesos producidos en la línea de unión entre micelios monospóricos de especies heterotálicas (Moreau, 1933 b y c) y atribuirlos a modificación del medio por el metabolismo del micelio que se aproxima, quizás debido a una hormona segregada por él (1).

De todos modos, el análisis genético ha demostrado el carácter heterocariótico de las ascas. Lindgreen (1934), explica los resultados obtenidos por Moreau y Moruzi (loc. cit.), suponiendo que operaban con un micelio bisexual (heterocariótico), que por algún factor de esterilidad o incompatibilidad de los pares de núcleos, no produjo peritecas hasta que cierta hormona, difundida por el otro micelio, inactivó el factor de esterilidad.

b) Trabajo original.

Los cultivos se hicieron indistintamente en tubos, en placas o en frascos Erlenmeyer, sin que por eso hubiera diferencias en los resultados.

1. *Temperatura.*—Dispuse las experiencias según se ha dicho al tratar del crecimiento del micelio.

(1) Un fenómeno parecido al que observó Davis (O. Graminis) se me ha presentado en cultivos monospóricos de una *Cucurbitaria*. También aquí en la línea de contacto entre dos colonias procedentes de una misma espora, la fructificación (en este caso picnidios de *Camarosporium*) fué más precoz.

Fructificación y desarrollo del micelio, son dos procesos paralelamente afectados por este factor. Parece como si fuese necesario que las colonias alcancen determinado diámetro para que los esbozos fructíferos se hagan visibles a simple vista. Así se desprende de los resultados obtenidos, que resumo en este cuadro:

Edad	Temperatura.	20 días	40 días	60 días
»	4-6°	0		(15 mm.) 0
»	10-12°	(10 mm.) 0	(30 mm.) Comienzan a hacerse visibles.	(60 mm.) Muchas fructificaciones.
»	20°	(25 mm.) Comienzan a hacerse visibles.	(63 mm.) numerosísimas fructificaciones	

Medio: Agar-extracto de malta 2,5 %. En la oscuridad. Colonias monospóricas. Diámetros de las colonias, en milímetros.

2. *Iluminación.*—Al tratar del crecimiento del micelio, ya expliqué cómo preparé las distintas condiciones de iluminación.

Los resultados obtenidos demuestran que *L. Cavanillesii* no precisa de la iluminación en ningún momento de su desarrollo para fructificar. Ahora bien, si la luz no es indispensable, al menos favorece la fructificación, ya que los cultivos iluminados muestran un desarrollo de fructificaciones más precoz y abundante. Para el resultado es indiferente que los cultivos estén constantemente iluminados o que la luz actúe de modo intermitente. Este efecto de la iluminación en la aparición de fructificaciones, he podido observarlo con todas las temperaturas empleadas. Los datos se refieren siempre a cultivos en agar-extracto de malta, único medio ensayado.

3. *Composición del medio.*—Las experiencias de fructificación de que he dado cuenta hasta ahora, fueron hechas (como acabo de indicar), con cultivos en agar-extracto de malta. Cuando traté de conocer la posible influencia de la aneurina en la reproducción de esta *Leptosphaeria*, obtuve unos resultados inesperados, que me movieron a estudiar con más detalle el problema de la influencia de la composición del medio de cultivo en la fructificación del hongo.

En primer lugar, hice un ensayo, sembrando esporas en dos tubos que contenían agar-sintético (AS), uno de los cuales tenía, además,

vitamina B₁ (estufa a 20°). Comparando las colonias así obtenidas con las cultivadas en agar-extracto de malta, por de pronto me llamó la atención únicamente el mayor desarrollo de estas últimas. Así, pues, no me extrañó que cuando ya tenían (a los 25 días) abundantes fructificaciones maduras los tubos con agar-extracto de malta, no se hubieran formado éstas en los tubos de agar-sintético. Pero las colonias crecidas en este último medio, en su desarrollo continuado, llegaron a ser mucho mayores que las de agar-extracto de malta, cuando éstas tenían 30 días de edad. A pesar de todo seguían aquéllas sin fructificar; y esto sucedía tanto en el tubo con vitamina B₁, como en el desprovisto de ella.

Para comprobar estos resultados, dispuse una experiencia más amplia y sembré sendas esporas de *Leptosphaeria* en una serie de placas Petri; parte preparadas con aneurina, y las restantes sin ella. El medio, en todos los casos, fué agar-sintético (AS).

Cuando las colonias así obtenidas llegaron a tener más de 30 mm. de diámetro sin haber fructificado, di por terminada la experiencia (1) que confirmaba mis anteriores observaciones.

Como quiera que hasta entonces había obtenido siempre fructificaciones en los tubos de agar-extracto de malta sin ninguna dificultad, se presentaban, como posibles causas de estas diferencias, los siguientes factores:

a) Existencia de una substancia responsable en el extracto de malta.

b) Presencia de bacterias en el cultivo. A pesar de los intentos realizados, no logré impedir al principio que alguna bacteria quedara, sin duda, adherida a la pared de la espora, y resultase luego la colonia contaminada en mayor o menor grado, como ya expliqué anteriormente. Todos los cultivos hechos hasta entonces en agar-extracto de malta, llevaban, por tanto, bacterias. Los cultivos en (AS) estaban, en cambio, limpios de ellas, sin duda porque el carácter ácido del medio (Ph 6) dificultó su desarrollo.

c) Reacción del medio. De todos estos posibles factores, me pareció que este último era el más probable. Abundan en la literatura las indicaciones en este sentido; pero, además, éste podía ser también la causa efectiva de la posible influencia de otro de los factores por investigar: la presencia de bacterias.

Entre las complejas acciones de las bacterias asociadas a la colonia fungina, una de las conocidas es la de modificar, con su metabolismo, la reacción del medio (2).

(1) Una de las placas (agar con vitamina) la conservé, sin embargo, rebordeada con cinta adhesiva. A los cinco meses, seguía sin fructificar.

(2) Esto es lo que Raper (1939) demostró en el caso de la asociación entre diversas bacterias y *Dictyostelium discoideum*, nueva especie de Acrasial descubierta por ese autor. En su

A fin de estudiar las relaciones entre fructificación y reacción del medio, preparé primeramente una serie de placas con agar-sintético (AS), que ajusté a valores de Ph , comprendidos entre 4 y 8.

Hice las siembras tomando trozos pequeños, aproximadamente iguales, de una misma colonia (L/61, agar-sintético).

El resultado a los 30 días (20°), fué el siguiente (véase también fotos 14, 15 y 16):

Ph	4	5	6	7	8
FRUCTIFICACION	0	0	+	++	0 (*)

No corren, por tanto, completamente paralelos los efectos del Ph en el crecimiento del micelio y en la fructificación del mismo.

Pero lo más notable es, desde luego, la contradicción aparente entre estos resultados y los primeramente obtenidos. El agar-sintético sin ajustar de las primeras experiencias, tenía un $Ph = 6,5$, es decir, una reacción que está dentro de los límites que en esta experiencia se han mostrado como aptos para la fructificación. ¿Cómo entonces no fructificaron los primeros cultivos de la colonia L/61?

Para resolver esta cuestión, que se presentaba con resultados tan desconcertantes, empecé por disponer una nueva experiencia con un medio sintético; pero con el fin de evitar un cambio en la reacción del agar durante el crecimiento de la colonia y poder de este modo puntualizar con más exactitud la influencia del Ph en la fructificación, empleé uno fuertemente amortiguado con una mezcla de fosfatos (1).

El medio distribuido en placa Petri, fué ajustado a valores de Ph , comprendidos entre 3 y 9; los trozos sembrados pertenecían a la primitiva colonia procedente de la espora L/61, que seguía sin fructificar.

Los resultados coincidieron con los de la experiencia anterior. Sólo las colonias desarrolladas a Ph 6 y 7 fructificaron, y este último valor fué también el óptimo. No es necesario, por tanto, el extracto de malta,

notable trabajo demuestra cómo las bacterias que sirven de alimento al hongo, pueden vivir en medio peptonado sin necesidad de un hidrato de carbono fermentescible; pero, en este caso, el hongo no fructifica, e incluso se desarrolla muy poco. Si el hidrato de carbono es fermentescible, entonces la asociación bacteria-hongo es óptima y éste fructifica. La causa de esto radica en que las bacterias, en su metabolismo, originan una acumulación de amoniaco en el medio, procedente de la peptona. La alcalinidad resultante es tóxica para el hongo; pero si el carbohidrato es fermentescible, el medio queda neutro o ligeramente ácido al neutralizarse el amoniaco con los productos ácidos de la fermentación del azúcar.

(*) Es de advertir que en ese momento la colonia tenía un desarrollo muy parecido a la de $Ph = 6$. La misma colonia ($Ph = 8$) llegó a tener, con el tiempo, algunas fructificaciones rudimentarias, siempre en número menor que las placas con Ph 6, aun a igualdad en el desarrollo de la colonia.

(1) El mismo que se ha indicado al estudiar el crecimiento del micelio.

ni tampoco la asociación bacteriana para que el hongo fructifique (1).

Mientras realizaba estas experiencias, recordé un detalle hasta entonces inadvertido y que podía ser la clave de la contradicción aparente entre los primeros resultados y estos últimos. ¡El medio empleado en uno y otro caso no era *exactamente* el mismo!

En los primeros ensayos me había servido de tubos sobrantes de una experiencia realizada con otro hongo. Estos tubos estaban preparados con agar de la marca Merck, que era el que utilizaba primeramente; luego, al irse agotando las reservas de este agar, empecé a usar uno fabricado en España por la casa «Ibys».

Se imponía, por tanto, la siguiente experiencia: trozos de una misma colonia (sub-cultivos de la primitiva L/61) fueron sembrados en placas Petri con agar-sintético, empleando para ello agar de la firma Merck. Estas placas fueron ajustadas a los *Ph*: 4, 5, 6, 7, 8 y 9. También preparé otra placa con el mismo medio, sin ajustar (*Ph*=6), al que añadí una pequeñísima cantidad de extracto de malta.

El resultado, a los veinticinco días, confirmaba mis sospechas: ninguna de las colonias había fructificado (2), a excepción de la que llevaba la pequeña porción de extracto de malta (foto 17).

4. *Influencia de un Actinomyces en la fructificación.*—Estudiando un problema distinto del que ahora me ocupa, me llamó la atención el escaso desarrollo de una de las placas sembradas (3). Después de algún tiempo, esta placa apareció invadida por colonias de un *Actinomyces*.

Con tal motivo probé la acción inhibidora de ese *Actinomyces*, frente a una serie de hongos que tenía en cultivo (4), y entre ellos probé *L. Cavanillesii*.

El medio del cultivo fué (AS) (agar Merck) con un *Ph* aproximadamente = 6. En una de las placas sembré en el centro micelio de *L. Cavanillesii* (sub-cultivo de L/61), y a unos 50 mm. de este punto, sembré el *Actinomyces*. Al objeto de que sirviera de testigo, en otra placa análoga sembré únicamente micelio de *Leptosphaeria*.

El resultado, a los dieciocho días (20°), fué el que puede verse en la foto 20.

En la región de la colonia, situada frente al *Actinomyces*, no hubo crecimiento. Pero la acción del *Actinomyces* sobre la colonia de *Leptos-*

(1) De todos modos, las fructificaciones así obtenidas se revelaron al microscopio como estériles, en muchos casos, y las demás tenían ascas en número mucho menor que las que se desarrollaron en agar-extracto de malta.

(2) Las placas con *Ph*=6 y *Ph*=7, las conservé, y al cabo de tres meses seguían sin fructificar.

(3) Los cultivos en cuestión, eran de una *Cucurbitaria* hallada sobre *Ononis tridentata*.

(4) Los resultados obtenidos, quizás sean objeto de otra publicación. Aquí sólo adelantaré, a título de curiosidad, que sólo dejó de manifestarse el antagonismo frente a un *Verticillium* y a un *Penicillium*.

phaeria se manifestó también de otro modo inesperado: provocando la fructificación del hongo.

La placa testigo (foto 21) tenía un contorno circular y, de acuerdo con lo que era de esperar, por la experiencia que poseía del caso, no había fructificado. A los dos meses de edad, continuaba sin fructificar y dí por terminada la experiencia. Los corpúsculos que se apreciaban en ella (de tamaño mucho mayor que el que tendrían las fructificaciones), no tenían estructura parenquimática, ni consistencia de esclerocios; eran simples glomérulos de clamidosporas, que recordaban los hallados por Killian (1928) en *Diplocadium minus*.

¶ Esta prueba la he repetido varias veces (véase también la foto 18) y siempre con el mismo resultado. En alguna de estas experiencias, he medido el valor del *Ph* del agar en la región situada entre la colonia del *Actinomyces* y la de *Leptosphaeria*, así como en otros lugares. El *Ph* resultó, aproximadamente (1) el mismo, en los distintos puntos de la placa. Posteriormente hice los ensayos de cultivo con diferentes valores de *Ph*, que terminaron de demostrarme cómo el efecto del *Actinomyces*, en la fructificación del hongo, no es simple consecuencia de una alteración del valor del *Ph* por metabolismo de aquél.

En los fenómenos de antagonismos microbianos se distinguen varias categorías, por lo que se refiere al modo de actuar. En algunos casos es necesaria la presencia del organismo antagónico; en otros producen el mismo efecto sus filtrados. Para comprobar este extremo, preparé una placa con agar-sintético, y sembré en su centro micelio de *L. Cavanillestii*. Al mismo tiempo, en un Erlenmeyer que contenía el mismo líquido nutritivo empleado en la preparación del agar, coloqué un trozo de colonia del *Actinomyces*.

A los quince días pasó el líquido de metabolismo de este *Actinomyces* por un filtro de amianto y coloqué unas gotas del filtrado en una excavación hecha en el agar con el asa de platino, junto al borde de la colonia de *Leptosphaeria*.

Al día siguiente de colocar las gotas, ya se empezaron a manifestar los efectos; pues el micelio, situado en las proximidades, comenzó a elevarse, cosa que he comprobado en todos los casos al colocar el *Actinomyces* frente a la colonia de *L. Cavanillestii*.

A los cinco días se podían apreciar claramente numerosas fructificaciones en el borde de la colonia, frente al que había colocado el filtrado (foto 19) (2).

(1) También, en esta determinación, me serví de los papeles indicadores Merck.

(2) Como se estropeará una primera foto obtenida de este cultivo, a los pocos días hice esta segunda, en la que, si bien puede verse el resultado de la experiencia, queda deslucida por las numerosas huellas producidas al extirpar colonias de mohos, de que se contaminó, al abrir la placa con ocasión de la primera foto.

El estudio microscópico reveló otro curioso efecto del *Actinomyces* en las fructificaciones del hongo que me ocupa. Las fructificaciones provocadas por el *Actinomyces*, poseen un ostiolo alargado, a modo de cuello o sifón (foto 11), bien distinto del ostiolo papilar de las obtenidas en los demás casos. Por lo demás, tales fructificaciones no sólo son fértiles, sino que desarrollan tantas ascas como puedan hacerlo las crecidas en extracto de malta; también, por lo común, tienen varios ostiolos.

5. *Experiencias con cultivos monospóricos y polispóricos.*—Técnica: En otra parte de este trabajo, he explicado la técnica seguida, en algunos casos,⁶ para mis aislamientos monospóricos. Aquí referiré, únicamente, alguna modificación introducida cuando se trata de aislar esporas de un *Ascomiceto*.

En los primeros ensayos, chafada simplemente una periteca en una gota de agua sobre un cubre, y de la suspensión así obtenida, trataba de aislar las esporas. Pronto advertí lo difícil que resulta capturar esporas cuando nadan en una capa de agua de relativo espesor, así como la dificultad de seguir rigurosamente, con el microscopio, la marcha de la misma, por la convexidad de la gota de agua. Además, si para capturarlas con más facilidad se llevan con la aguja al borde de la gota, tras de ser difícil de sortear el inconveniente que para ello se deriva de la tensión superficial, se corre el peligro de que la espóra quede pegada a la parte seca del cubre, y en ese caso, al tocarla con el extremo de la microaguja, suele resultar lastimada.

Las mejores condiciones para la captura, las conseguí procediendo como sigue:

Una vez preparadas las gotas de agar sobre los cubres, como de costumbre se procede a chafar una fructificación en otro cubre con una gota de agua, todo, naturalmente, con las debidas precauciones (1). Esta suspensión de esporas, vuelta hacia arriba, se aproxima a una gota de agar hasta poner las dos gotas en contacto; separadas luego las gotas, habrán quedado algunas ascas y esporas, junto con cierta cantidad de agua sobre la superficie del agar. Conviene, por lo tanto, dejar el cubre con agar sobre un anillo de vidrio, dentro de una caja Petri seca, hasta que el exceso de agua se haya evaporado. Quedan así las esporas colocadas sobre la superficie húmeda y resbaladiza del agar, y en estas condiciones su captura, con la aguja, es empresa fácil.

Resultados obtenidos: Sirviéndome de la técnica que acabo de explicar, he hecho cerca de 70 siembras; unas veces han sido éstas monospóricas, otras veces sembré ascas completas.

Tanto en uno como en otro caso, las colonias resultantes produjeron fructificaciones si las condiciones del medio eran adecuadas, de acuerdo con lo expuesto anteriormente. A una misma edad, las colonias polispó-

(1) En el caso de *L. Cavanillesii*, por tratarse de cultivos puros, no fué necesario desinfectar la fructificación.

ricas fueron algo mayores que las monospóricas. También fructificaron siempre aquéllas algunos días antes que éstas, en igualdad de las demás condiciones.

L. Cavanillesii es, por lo tanto, una especie homotálica.

c) **Comentario.**

Entre las particularidades reveladas en estos cultivos, interesa, ante todo, hacer resaltar: el carácter homotálico, la existencia de un factor (o factores) específico de la fructificación y una cierta dependencia entre el comienzo de ésta y el tamaño de la colonia.

Las repetidas experiencias de cultivo monospórico (realizadas con más de 30 esporas) y en algún caso, con el de L/61, seguidas durante tres generaciones, no dejan lugar a dudas respecto a la homotalia de la especie. Con todo, el comportamiento de las colonias monospóricas y el de las polispóricas *no es exactamente el mismo*.

La diferencia de diámetros en las colonias de la misma edad es perfectamente explicable, teniendo en cuenta que en un caso proceden de las cuatro células de una espora, y en el otro, de las 32 células que suman entre las ocho esporas de un asca.

Lo que ya se presta a diversas interpretaciones es el hecho de la mayor precocidad de la fructificación en las colonias polispóricas. No es, por lo tanto, necesaria una determinada edad de la hifa para que en ella se despierte la actividad carpogénica. La capacidad del todo es aquí mayor que la suma de las capacidades de las partes y, en igualdad de las demás condiciones, no se comportan del mismo modo a este respecto ocho colonias, monospóricas, cada una de masa e , que una colonia polispórica de masa $= 8 e$.

Parece como si fuese necesaria la existencia de una cierta masa miceliar, que, según los datos arriba detallados, correspondería a una colonia de unos 25 mm. de diámetro. Esta masa se alcanza a 20° en la mitad de tiempo que a 10-12°, y tarda más en alcanzarse partiendo de una espora que si colaboran las ocho esporas de un asca.

Todo esto puede interpretarse admitiendo la producción por la hifas, de una substancia específica u hormona, de la que sería necesaria una cierta cantidad en el medio de cultivo para que se inicie y prosiga la fructificación. La cantidad sintetizada estará en razón directa de la masa miceliar que colabora en ello.

Este comportamiento guarda semejanza con lo observado por otros investigadores en cultivos monospóricos de ciertas cepas de especies heterotálicas, que les llevó en algún caso, según dije más arriba, a poner en duda el carácter híbrido de los ascomas producidos en combinaciones binarias de micelios monospóricos, desarrollando la teoría

harmónica de la formación de las peritecas en los Ascomicetos (Moreau, 1937).

Es oportuno advertir que tales diferencias, encontradas por mí entre micelios monospóricos y polispóricos, se refieren a colonias cultivadas en extracto de malta; no existe, por lo tanto, en este medio la substancia específica a que me refiero, o por lo menos no está en cantidad suficiente.

Aparte del factor cuya capacidad de síntesis por parte del micelio parece desprenderse de mis experiencias, según llevo comentado, estas mismas experiencias han revelado la existencia de otro u otros factores presentes en el extracto de malta, así como en el agar «Ibys» y en el líquido de metabolismo de un *Actinomyces*, aislado en el curso de estos trabajos.

Adviértase cómo la fructificación provocada por la presencia del *Actinomyces* podría interpretarse, de acuerdo con las ideas clásicas, como determinada por la detención brusca del crecimiento; pero no es este el caso, ya que si el *Actinomyces* inhibe el crecimiento del micelio, el extracto de malta (basta, como ya he indicado, una mínima cantidad de tal producto) la favorece.

La acción del *Actinomyces* es, por lo tanto, doble; por un lado, desarrolla una actividad antagónica (no sólo frente a *L. Cavanillesii*, sino frente a la mayoría de las especies que llevo ensayadas); por otro, sintetiza en su metabolismo un factor que provoca la fructificación de esta *Leptosphaeria*, aunque no la de otros hongos experimentados con este objeto. El efecto morfogénico provocado en *L. Cavanillesii*, por este *Actinomyces*, constituye un nuevo ejemplo entre los ya conocidos de acción telemórfica de unos microorganismos sobre otros.

De todos modos, de los datos bibliográficos a mi alcance, resulta ser esta la primera vez en que se registra un caso de fructificación, debida a un estímulo producido por un Actinomiceto.

Aún cabe señalar otra particularidad de la acción del *Actinomyces* sobre esta *Leptosphaeria*; me refiero al carácter rostrado de las fructificaciones así obtenidas, que contrasta con el aspecto papilar del ostiolo en las formadas en agar-extracto de malta. Al contemplar fructificaciones de estas dos clases (fotos 11 y 12), más de un «sistemático» que desconociera su común origen, las consideraría, no ya de especies, sino de géneros distintos. Este caso es parecido al que refiere Servazzi (1938).

En la bibliografía se encuentran referencias de la acción estimulante del agar en algunos casos (Bortels, 1939; Robbins, 1939a y 1939b).

De mis experiencias se deduce la existencia de uno o varios factores en el agar «Ibys», que faltan en el agar de la firma Merck.

El proceso del desarrollo de la fructificación, según ha referido, es complejo, y es posible que alguna o algunas de sus fases requieran,

para su realización, un factor específico que no intervenga en las demás. De este modo podría explicarse la formación de fructificaciones más o menos estériles en el agar «Ibys» (cuando este producto es el único que suministra principios activos al medio, suponiendo que en él falta, o está en cantidad sub-óptima, alguno de los factores necesarios, presentes, en cambio, en el extracto de malta o en el líquido de metabolismo del *Actinomyces*.

Otra conclusión que cabe sacar de mis experiencias es que entre los factores contenidos en el extracto de malta, a que me acabo de referir, la vitamina B₁ no es el único que interviene en la fructificación. De los ensayos realizados con tal objeto, parece desprenderse la falta absoluta de intervención de la aneurina como factor en la reproducción del hongo; pero hay que guardar ciertas reservas en relación con esto, ya que algunas de las exigencias de esta clase de comprobaciones no han podido ser satisfechas en mis experiencias.

Holz (1937), demostró la intervención de la luz en la localización del ostiolo y obtuvo peritecas de *Venturia inaequalis* (CKe.) Wint. con varios ostiolos en los cultivos mantenidos a la oscuridad. Pero el caso es que las fructificaciones de mis cultivos de *Leptosphaeria* han presentado esta anomalía, tanto en los que permanecieron a la oscuridad como en los iluminados.

3. *Posición sistemática*.—El hongo estudiado pertenece, dentro del género *Leptosphaeria*, al grupo de los que tienen esporas pequeñas. A mi parecer entra dentro del círculo de especies afines a *L. Coniothyrium* Sacc.; el exosporio punteado, por otra parte, presta a la especie una característica bastante singular dentro del género. Esto es lo que puede dar de sí el examen esporológico.

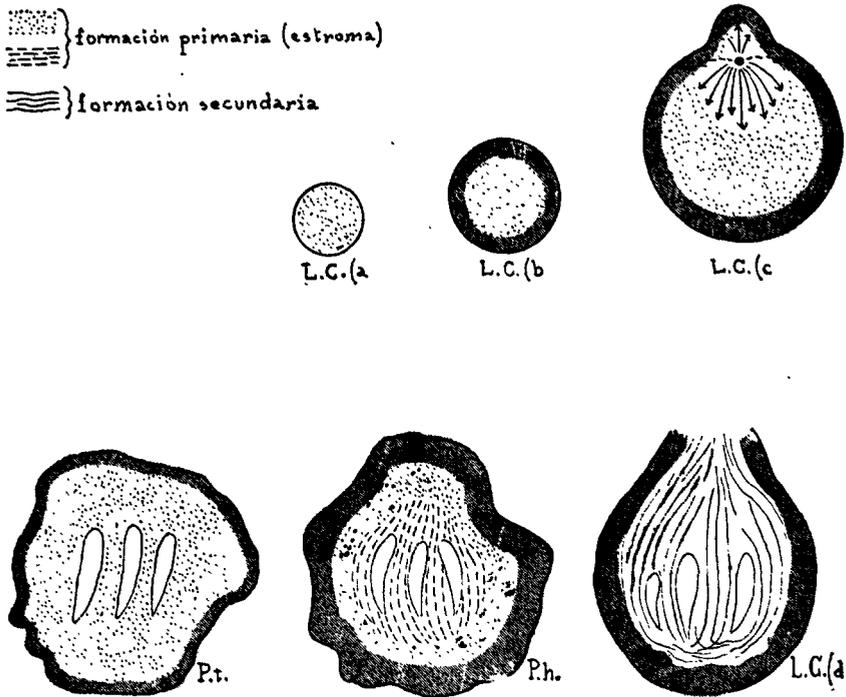
Por la estructura de sus fructificaciones pudiera considerarse (sobre todo si se examinan ascomas en un estado algo avanzado de su desarrollo) como una forma de las más diferenciadas dentro de los Pseudosferiáceos (estado núm. 4, o combinación de los números 4 y 3 de Petrak). Pero en realidad se trata de un tipo de estructura que considero nuevo.

Del mismo modo que «paráfisis verdaderas» y «fibras parafisoides intertecales», son formaciones análogas, pero de significación muy diferente, así considero yo también las «fibras secundarias», nacidas en el centro sub-ostiolar como formaciones análogas a las anteriormente citadas, pero fundamentalmente distintas de ellas.

En los esquemas siguientes trato de expresar esto. En uno de ellos represento los primeros estados del desarrollo de la fructificación en *L. Cavanillesii*.

En el otro están reproducidas, esquemáticamente, las estructuras de dos Pseudosferiáceos, así como la de *L. Cavanillesii* (las dos primeras figuras están inspiradas en las originales de Theissen y Arnaud, que se

refieren, respectivamente, a *Pyrenophora trichostoma* y a *Pl. herbarum*).



En los Pseudosferiáceos superiores las fibras parasfoides intertecales, por muy parecidas que sean a los verdaderos parasfos, son *porciones del estroma medular primario* y, por tanto, homólogas a las células del estroma intertecal de los Dothioráceos. Las fibras del conceptáculo de *L. Cavanillesii* tiene su extremo superior soldado a la corteza de la fructificación como las fibras parasfoides, pero difieren de éstas por no proceder de la transformación del estroma medular; representan *una formación nueva independiente del estroma*, y en esto último, coinciden con los verdaderos parasfos y, como ellos, también tienen un extremo libre (sin conexión con el estroma cortical). Pero en los «verdaderos parasfos», el extremo libre es el superior (extremo «oral»), mientras que en las fibras secundarias de *L. Cavanillesii* es el inferior (extremo «aboral») el que está desconectado del estroma cortical.

Conviene hacer resaltar que se trata de un tipo de estructura que no encaja entre los Esferiales, ni entre los Pseudosferiales, ni puede, en

modo alguno, considerarse como intermedio entre estos dos grupos. Hasta tanto no se conozcan mejor los Pseudosferiales, no puede decirse nada; pero es muy posible que una revisión de las formas incluídas entre los Pseudosferiales, simplemente por tener fibras soldadas por su extremo superior, pueda dar lugar al descubrimiento de nuevos casos de ontogenia, análoga a la de *L. Cavanillesii*, que habría de reunir en un nuevo grupo despejado de los clásicos Pirenomicetos.

• No me ha sido posible identificar la especie con ninguna de las numerosas del género descritas hasta ahora, y la considero como nueva, a la que nombro *L. Cavanillesii*, en el año del segundo centenario del nacimiento del insigne botánico.

SUMMARY:

1. From a branch of *Lavandula* sp. gathered in Barbuñales (Huesca) a species of *Leptosphaeria* has been isolated, the characteristics of which are fully described in this paper.

2. The fruit body formation begins by the division of an hyphal cell.

In the central region of young primordia there are some multinucleate cells of greater size than the other. Those cells, in which is noticed more or less clearly an spiral arrangement, must be considered as elements of a reduced ascogon.

3. In the older primordia are to be distinguished both a cortical and a medullar region, in which the parenchymatous tissue begins to suffer an histolytical degeneration. In a spot of the cortical region, a meristem point is developed («Subostiolar centre»). The situation of this point determines the further position of the ostiole.

4. The «nucleus» of the fruit body owes its origin to a secondary tissue produced by the «subostiolar center» and constituted by fibres that in their growth finish in occupying the whole central region of the fruit body after having repelled and displaced to the basis the remaindes of the medullar parenchymatic primar tissue. These fibres appear from the beginning individualised and with no connection to the cortex of the base.

Later on the «subostiolar centre» crowd towards the exterior some other fibres which elevate the cortical layers and determine the formation of the ostiole.

5. The asci are not produced in typical ascogenous hiphae.

6. The systematic position of this fungus is discussed. Like in the «ascolocular» Pseudosphaeriaceen, the «interthecal» fibres in this fungus

are attached above with the cortical layers, but between both kind of fibres there are merely an analogy. The interthecal paraphisoid fibres of the Pseudosphaeriaceen represent portions of primary medullar stroma more or less transformed; whereas the «nucleus» fibres of *L. Cavanillesii* are of secondary origine.

7. Some researches concerning the conditions of germination, mycelium growthen and fruit body formation were performed.

8. The *Ph* values for fruit body formation are comprised in the range 6-8.

9. Malt-extract, agar of the firm «Ibys», and metabolism liquid from an *Actinomyces* sp. contain a factor (or factors) which promote fruit body formation in *L. Cavanillesii*.

10. The results obtained allow also to assume the existence of another factor sintetized by the mycelium of *L. Cavanillesii*, a certain quantity of which is necessary to promote fruit body formation.

11. *Actinomyces* sp. acts further inhibiting miceliar growth of *L. Cavanillesii* and promoting the elongation of the fruit body ostiole.

12. Monospore cultures have revealed homothallism in *L. Cavanillesii*.

BIBLIOGRAFIA

- AMES (L. M.): «An hermaphroditic self-sterile but crossfertile condition in *Pleurage anserina*». (*Bull. Torrey Bot. Club*, 59), 1932.
- ARNOLD (CH. A.): «The development of the perithecium and spermogonium of *Sporormia leporina* Niessl». (*Am. Journ. of Botany*, Vol. 15), 1928.
- BESSEY: «Textbook of Mycology». Philadelphia, 1935.
- BEZSSONOF (N.): «Über die Züchtung von Pilzen auf hoch konzentrierten rohrzuckerhaltigen Nährböden und über die Chondriomfrage». (*Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, XXXVII), 1919.
- BORTEIS (H.): «Über die Wirkung von Agar, sowie Eisen, Molybdän, Mangan und anderen Spurelementen». (*Zentralbl. f. Bakt.* II, Abt. 100), 1939.
- CAMARA (E. DE. S. DA.): «Contribuciones ad mycofloram Lusitaniae». Centuria X. (*Rev. Agron.*, XX, 1), 1932.
- CLAUSSEN (P.): «Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten *Pyronema*». (*Z. f. Bot.*, 4), 1912.
- COONS: «Factors involved in the growth and pycnidium formation of *Plenodomus fuscomaculans*». (*Journ. Agr. Res.*, p. 713), 1916.
- CORRENS (C.): «Bestimmung, Vererbung und Verteilung des Geschlechts bei den höheren Pflanzen». (*Handb. d. Vererbungswiss. Lief.* 3), 1928.
- DANGEARD (P. A.): «Sur l'origine du perithecté chez les Ascomycetes». (*Le Botaniste*, 10), 1907.
- DAS GUPTA (S. N.): «On the culture behaviour of a species of *Rosellinia*. II Further Experiments on the Production of Perithecia». (*Proc. Ind. Acad. S.*, 7), 1938.
- DENNY (F. E.): «Oxygen requirements of *Neurospora sitophila* for formation of perithecia and growth of mycellium». (*Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 5), 1933.
- EDGERTON (G. W.): «Plus and minus strains in the genus *Glomerella*». (*Amer. Journ. of Botany*, 1), 1914.
- ELISEI (F. G.): «Ricerche sulle germinazione delle ascospore e sulla origine dei periteci della *Sporormia Pollacei* El.». (*Atti Ist. Bot. R. Univ. Pavia Ser.*, IV, 11), 1939.
- GÄUMANN (E.): «Vergleichende Morphologie der Pilze». Jena, 1926.
- «Neuere Erfahrungen über die Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten». (*Zeitschr. f. Bot.*, 35), 1940.
- GREIS (H.): «Mutations- und Isolationsversuche des Geschlechts von *Sordaria fimicola*». (*Zeitschr. f. Bot.*, 37), 1941.
- GROSSENBACHER (I. G.): «*Mycosphaerella* wilt of melons». (*Techn. Bull. n.º 9. New York Agr. Exp. Station*), 1909.
- HARTMANN (M.): «Verteilung, Bestimmung und Vererbung des Geschlechts bei den Protisten und Thallophyten». (*Hand. d. Vererbungswissenschaft, E. Bd. II*), 1929.
- «Die Sexualität». Jena, 1943.
- HAWKER (LILIAN) LILIAN (E.): «Effect of Growth substances on growth and fruiting of *Melanospora destruens*». (*Nature*, 142), 1938.
- CHAUDHURI (S. D.): «Growth and fruiting of certain Ascomycetous fungi as influenced by the nature and concentration of carbohydrate in the medium». (*Ann. Bot. Lond. N. S. X.*, 38), 1946.
- HIGGINS (B. B.): «Morphology and life history of some Ascomycetes with special reference to the presence and function of spermatia». (*Amer. Journ. Bot.*, 23), 1936.
- HÖHNEL (F. V.): «Fragments zur Mykologie III». (*Sitzb. Ak. Wiss. Wien. 116. B. Abt.*, 1), 1907.
- «Über die Gattung *Leptosphaeria* Ces et de Not.». (*Ber. d. d. Bot. gesellsch. Bd.*, 36), 1918 a.
- «Über *Leptosphaeria personata* Niessl». (*Ann. Myc.*, XVI), 1918 b.
- «Über die Verwandtschaft der Gattung *Dothiora* Fries». (*Ann. Myc.*, XVI), 1918 c.
- HOLZ (W.): «Einfluss des Lichtes auf die Peritheccienbildung von *Venturia inaequalis* Aderh.». (*Zentralbl. f. Bakt. Abt.*, II, 95), 1937.
- HÜTTIG: «Über Einfluss der Temperatur auf die Keimung und Geschlechtverteilung bei Brandpilzen». (*Z. f. Bot.*, XXIV), 1931.

- HÜTTIG: «Die Sexualität bei *Glomerella Lycopersici* Krüger und ihre Vererbung». (*Biol. Zentralbl.*, 53), 1935.
- JOST (L.): «Vorlesungen über Pflanzenphysiologie», B II, 1925.
- KERL (I.): «Über Regenerationsversuche an Fruchtkörpern und andere entwicklungsphysiologische Untersuchungen bei *Pyronema confluens*». (*Zeitschr. f. Bot.*, 31), 1937.
- KILLIAN (K.): «Über die Sexualität von *Venturia inaequalis*». (*Zschr. f. Bot.*, 9), 1917.
- KILLIAN (Ch.): «Le développement du *Dothidella ulmi*». (*Rev. gen. Bot.*, 32), 1920.
- «Études comparatives des caractères culturels et biologiques chez les Deuteromycètes et les Ascomycètes parasites». (*Ann. d. Sc. Nat.* 2.^a serie. *Bot.*, T. X.), 1928.
- KLEBAHN (H.): «Haupt und Nebenfruchtformen der Askomyzeten». Leipzig, 1918.
- KLEBS (G.): «Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze». (*Jahrb. Wiss. Bot.*), 1896.
- «Fortpflanzung der Gewächse». (*Physiologie*) (*Handwörterbuch. d. Naturwissenschaften*, Vol. IV), 1913.
- LAIBACH (F.): «Über die Bedingungen der Perithezienbildung bei den Erysipheen». (*Jahrb. Wiss. Bot.*, 72), 1920.
- LEHMANN. «Pod and Stem Blight of Soybeans». (*Ann. of the Missouri Bot. Garden*, X), 1923.
- LEONIAN (L. M.): «The physiology of peritheclum and pycnidium formation in *Valsa leucostoma*». (*Phytopathology*, 13), 1923.
- «A study of factors promoting pycnidium-formation in some Sphaeropsidales». (*Am. J. of Bot.*, XI), 1924.
- LINDEGREN (C. C.): «The genetics of *Neurospora*. V. Selfsterile bisexual Heterokaryons». (*Journ. Genetics*, 28), 1924.
- MILLER (J. H.): «Biologic studies in the Sphaeriales I». (*Mycologia*, XX, n.º 4), 1928.
- «Biologic studies in the Sphaeriales II». (*Mycologia*, X, n.º 6), 1928.
- GWENDOLYN BURTON (M.): «Study of *Bagnisiopsis* species on the Melastomaceae». (*Mycologia*, Vol. XXXV, n.º 3), 1943.
- MOLLIARD: «Sur le rôle des Bactéries dans la production des périthèces de l'*Ascobolus*». (*C. R. Ac. Sc., Paris*), 1903.
- MOREAU: «Sur la theorie hormonale de la formation des peritheces des Ascomycetes». (*Bull. Soc. Myc. France*, 53), 1937.
- «Action de l'adrenaline sur la formation des sclerotes et des peritheces chez les champignons du genre *Neurospora*». (*C. R. Seanc. Soc. Biol. Paris*, 128), 1938 a.
- «La formation hormonale des peritheces chez les *Neurospora*». (*C. R. Acad. Sc.*, 206), 1938 b.
- «Existe-t-il des peritheces hybrides chez les Ascomycetes?» (*Bull. Soc. Bot. France*, 85), 1938 c.
- F. ET MORUZI (C.): «Sur l'identification des sexes des races + et - des Ascomycètes heterothaliques». (*C. R. Soc. Biol.*, 108), 1931.
- «Sur des reactions sexuelles imperfaites chez les Ascomycètes du genre *Neurospora*». (*C. R. Seanc. Soc. Biol. Paris*, 111), 1932.
- MORUZI (C.): «Recherches cytologiques et expérimentales sur la formation des périthèces chez les Ascomycètes». (*Rev. Gen. de Botanique*, 44), 1932.
- NANNFELDT (J. A.): «Studien über die Morphologie und Systematik der Nicht-Lichenisierten Inoperculaten Discomyceten. Uppsala», 1932.
- NIETHAMMER (A.): «Wachstumsversuche mit mikroskopischen Bodenpilzen». (*Arch. Mikrobiol.*, IX, 1), 1938.
- PETRAK (F.): «Über die Pseudosphaeriaceen V. Höhnel und ihre Bedeutung für die Systematik der Pyrenomyzeten». (*Ann. Myc.*, XXI), 1923.
- «Über die Gattung *Oraniella* Speg». (*Ann. Myc.*, XXXIV), 1936.
- «Über die Gattung *Mycotodea* Kirschst». (*Ann. Myc.*, XXXVIII), 1940.
- RAPER, KENNETH (B.): «Influence of culture conditions upon the growth and development of *Dictyostellium discoideum*». (*Journ. of Agricultural Research*. Vol. 58, núm. 3), 1939.
- ROBBINS (W. J.): «Growth substances in agar». (*Amer. J. Bot.*, 26), 1939 a.
- «Growth substances and gametic reproduction by *Phycomyces*». (*Bot. Gaz.*, 101), 1939 b.
- ROBBINS (W. J.) and SCHMITT (M. B.): «Factor Z₂ and gametic reproduction by *Phycomyces*». (*Am. Journ. of Botany.*, 32), 1945.
- ROBINSON: «The conditions of growth and development of *Pyronema confluens*». (*An. of Bot.*, 40), 1926.
- SARTORY (A.): «De l'influence d'une bactérie sur la production des peritheces chez un *Aspergillus*». (*C. R. Soc. de Biol.*, 79), 1916.

- SARTORY (A.) et MEYER (R. J.): «Recherches sur les causes de l'apparition des périthèces chez *Aspergillus fumigatus*». (C. R. Ac. Sc. t., CLXXXIV), 1926.
- SARTORY (R.) et MEYER (J.): «La formation des peritheces chez l'*Aspergillus fumigatus* Fres. sous l'influence du radium». (C. R. Acad. Sc. Paris, 183), 1926.
- SCHOPFER (W. H.): «Recherches sur l'influence du milieu nutritif sur la formation des zygotes chez les Mucorinées heterothaliques». (C. R. Soc. Phys. et Hist. Nat. Geneve, 44), 1927.
- «Plants and vitamins». (Waltham, Mass., U. S. A.), 1943.
- SCHWARTZ (W.): «Die Zygoten von *Phycomyces Blakesleanus*. Untersuchungen über die Bedingungen ihrer Bildung und Keimung». (Flora N. F., 121), 1926.
- SERVAZZI (O.): «Intorno ad un caso di disseccamento osservato su *Araucaria*. (Boll. Lab. sper. R. Oss. Fitopat. Torino, XV, 1-2).
- SHEAR (C. L.) and DODGE (B. O.): «Life histories and heterotallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group». (Journ. Agr. Res, 34), 1927.
- STEVENS (F. L.): «The effects of ultra-violet irradiation on various Ascomycetes, Sphaeropsidales and Hyphomycetes». (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, 82).
- THEISSEN: «Zur Phylogenie der Pseudosphaeriaceen». (Verh. Zool. Bot. Ges., Wien.), 1916.
- «Neue Originaluntersuchungen über Ascomyceten». (Verh. Zool. Bot. Ges., Wien.), 1918.
- THEISSEN (F.) und SYDOW (H.): «Vorentwürfe zu den Pseudosphaeriales». (Ann. Myc., XVI), 1918.
- URRÍES (M. J. DE): «Datos sobre micromicetos de la provincia de Huesca». (Bol. Soc. Esp. Hist. Nat., XXXII), 1932.
- «Datos para la flora española de micromicetos» (2.^a nota). (An. del Jardín Bot. de Madrid, T. I), 1941.
- «Hongos microscópicos de Navarra». (An. del Jardín Bot. de Madrid, T. II), 1942.
- «Un sencillo aparato para aislar esporas». (An. del Jardín Bot. de Madrid, T. V.), 1945.
- WEHMEYER: «A biologic and phylogenetic study of the stromatic Sphaeriales». (Amer. Journ. Bot., XIII), 1926.
- ZICKLER (H.): «Die Vererbung des Geschlechts bei dem Askomyzeten *Bombardia lunata* Zckl. (Ztschr. f. Ind. Abst. u. Vererb. Lehre, 73), 1937.
- ZIKES (H.): «Beitrag zur Zygosporienbildung durch äussere Factoren». (Centralblatt f. Bakt., Abt. 2, 68), 1926.
- ZOGG (HANS.): «Untersuchungen über die Gattung *Hysterographium* Corda, insbesondere über *Hysterographium fraxini* (Pers.) de Not.». (Phytopath. Zeitschr., XIV), 1943.

EXPLICACIÓN DE FIGURAS Y FOTOS (1)

- FIGURA 1.^a—Hifas del estrato medio.
- FIGURA 2.^a—Primeros estados del desarrollo de una fructificación.
- FIGURAS 3.^a y 4.^a—Dos fructificaciones en un estado algo más avanzado que en la figura 2.^a, con células ascogoniales en el centro.
- FIGURA 5.^a—Fructificación joven en que se inicia la formación de la cavidad central; en la misma figura se ven tres hifas ascógenas.
- FIGURAS 6.^a a, 6.^a b y 6.^a c.—Ascas en proceso de formación.
- FIGURAS 7.^a a y 7.^a b.—Ascas jóvenes en su fase de alargamiento.
- FIGURA 7.^a c.—Relaciones entre ascas jóvenes y base de fibras secundarias.
- FIGURA 7.^a d.—Célula ensanchada en la base de una fibra secundaria.
- FIGURA 8.^a—Ascas jóvenes, cuyo contenido comienza a segmentarse en ocho esporas binucleadas.
- FIGURAS 9.^a a-f.—Esporas en sucesivos estados de desarrollo; *g* y *h*: esporas maduras.
- FIGURA 10.—Detalle de la región cortical de una fructificación con dos centros subostiolares de reciente formación.
- FIGURA 11.—Uno de los conceptáculos de una fructificación doble. Las células crecidas por encima del centro subostiolar, en su alargamiento, han elevado y roto la capa de células corticales que constituirá la pared del ostiolo.
- FIGURA 12.—Sección de una fructificación joven con centros subostiolares en dos polos opuestos.
- FIGURA 13.—Sección de una fructificación joven según un plano que pasa por el borde de un centro subostiolar. Los elementos sueltos de la parte inferior son fibras secundarias, procedentes de otro centro, cortadas de través.
- Foto 1.—Estratificación del micelio.
- Foto 2.—Colonias de *L. Cavanillesii* J. Urr., en agar-extracto de malta. Las dos de la izquierda crecieron en la oscuridad; las dos de la derecha, estuvieron constantemente iluminadas. Edad: 20 días. Temperatura: 20°.
- Foto 3.—Fructificación muy joven. La formación secundaria, originada por el centro subostiolar, comienza su crecimiento, y desplaza al estroma primario de la región medular del primordio.
- Foto 4.—Un estado análogo al anterior.
- Foto 5.—Sección de una fructificación joven con tres sistemas de fibras. En la base de dos de estos sistemas se aprecia la dislocación de los

(1) Dibujos de la Srta. Millán. Microfotos: Antonio Rodríguez, de este Jardín Botánico. Las microfotos fueron obtenidas en la Estación de Patología Vegetal; agradezco al Director de ese Centro, Ingeniero Agrónomo D. Miguel Benloch, las facilidades que me dió para ello.

elementos del estroma primario producida por la presión de las fibras secundarias en su avance centripeto.

- Foto 6.—Fructificación con dos conceptáculos. En el superior, algo más atrasado en su desarrollo, no han aparecido aún las ascas; sin embargo, las fibras secundarias son ya delgadas.
- Fotos 7, 8 y 10.—Fructificaciones jóvenes con dos conceptáculos en cada una. En la fructificación de la foto 8 se aprecia, en su polo inferior, un centro subostiolar de reciente aparición.
- Foto 9.—Fructificación joven con tres conceptáculos.
- Foto 11.—Fructificación de *L. Cavanillesii* crecida (medio A. S.) frente a un *Actinomyces* sp.
- Foto 12.—Fructificación de *L. Cavanillesii* crecida en agar-extracto de malta.
- Foto 13.—Fructificación madura. Sección meridiana. Las fibras que tapizan el ostiolo semejan auténticos perifisos.
- Foto 14.— $Ph = 6$. (Agar Iby). Medio: A. S. Temperatura: 20°. Colonia de 40 días. Escasas fructificaciones en el centro de la colonia.
- Foto 15.— $Ph = 7$. (Agar Iby). Medio: A. S. Temperatura: 20°. Colonia de 30 días. Abundantes fructificaciones en el centro y, sobre todo, a cierta distancia de él, donde su acumulación se revela en la foto por una franja oscura.
- Foto 16.— $Ph = 8$. (Agar Iby). Medio: A. S. Temperatura: 20°. Colonia de 60 días. A cierta distancia del centro, a derecha e izquierda, se ven algunos esbozos fructíferos que no terminaron su desarrollo.
- Foto 17.—(Agar Merck). Medio: A. S., adicionado de una pequeña cantidad de extracto de malta. Temperatura: 20°. Edad: 20 días. Abundantes fructificaciones bien desarrolladas (puntos oscuros).
- Foto 18.—Experiencia análoga a la reproducida en la foto 20. Las fructificaciones acumuladas en el borde de la colonia, orientado frente al *Actinomyces*, determinan su oscurecimiento.
- Foto 19.—En una grieta practicada en el agar (parte superior), junto al borde de una colonia crecida en las mismas condiciones que las de la foto 21, se colocaron algunas gotas del filtrado del líquido de metabolismo de *Actinomyces* sp. Nótese la elevación y los pliegues en la mitad superior de la colonia, donde se han desarrollado numerosas fructificaciones.
- Foto 20.—Colonias de *L. Cavanillesii* (en el centro) y de *Actinomyces* sp. (en la porción súpero-izquierda). El hongo ha fructificado en el borde de la colonia orientado frente al *Actinomyces*. Este, además, ha inhibido el desarrollo de aquél. (A. S., agar Merck). $Ph = 6$. Temperatura: 20°. Edad de 20 días
- Foto 21.—Colonia de *L. Cavanillesii* sin *Actinomyces*. Las demás condiciones son las mismas que en la foto anterior. Nótese la falta de fructificación y el desarrollo circular de la colonia. (Las manchas son debidas a defectos del vidrio de la cubierta de la placa).
-

FIGURAS



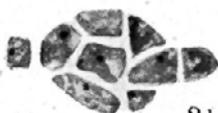
1a



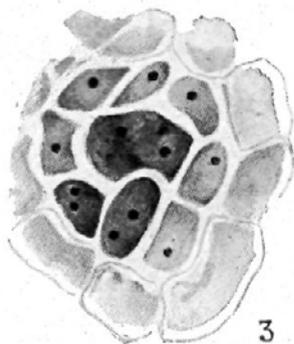
1b



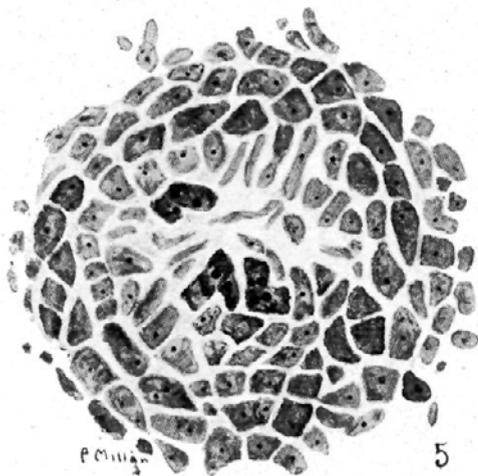
2a



2b



3

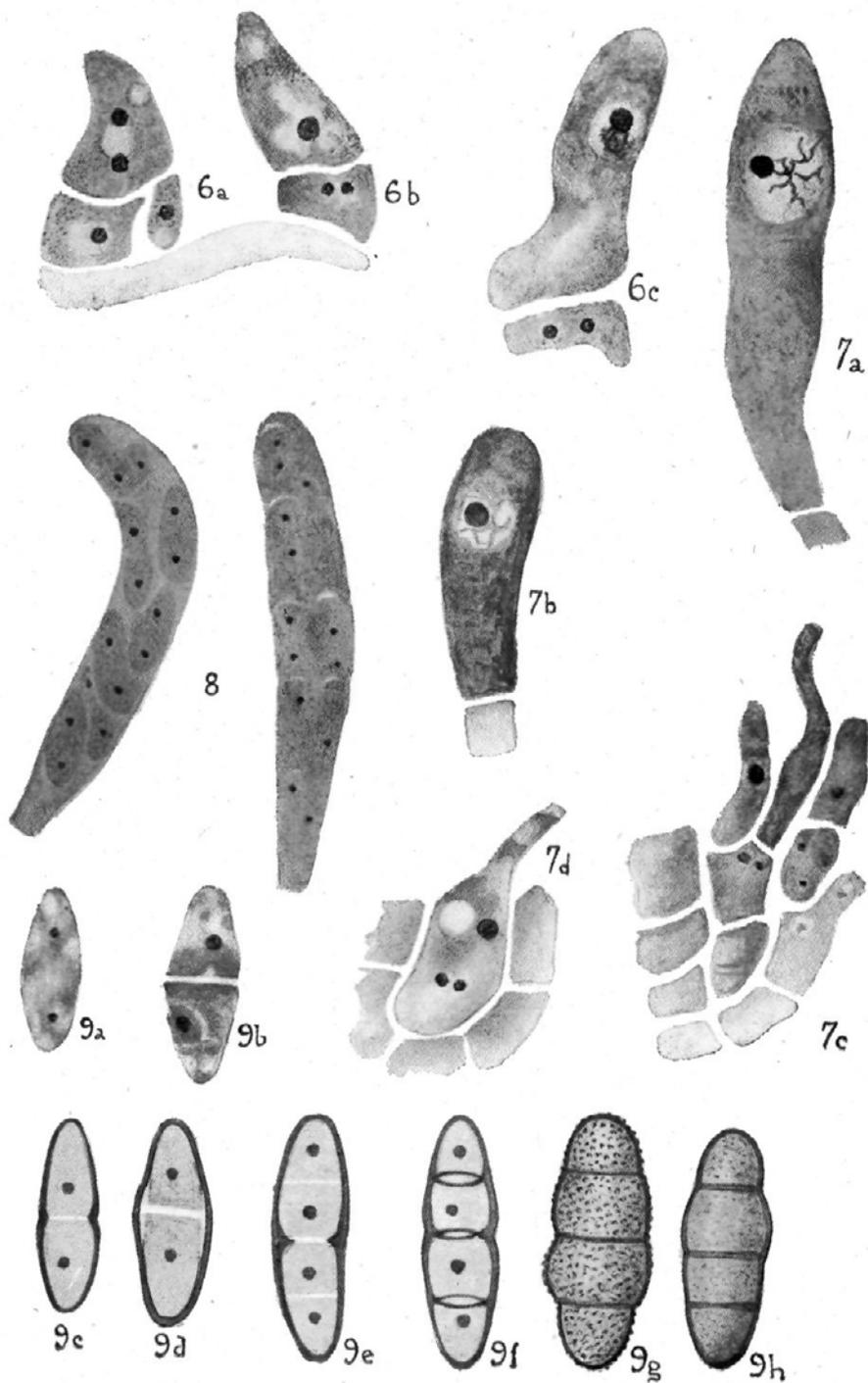


5

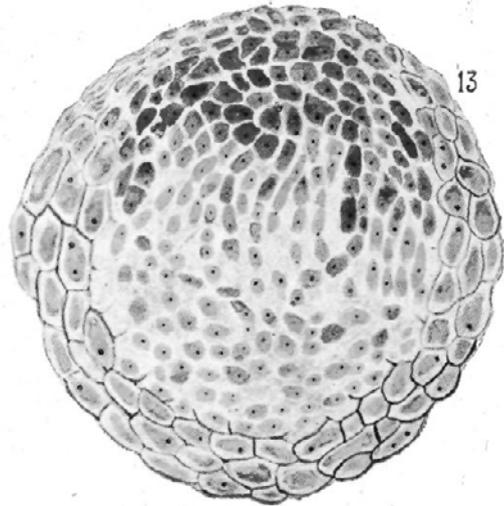
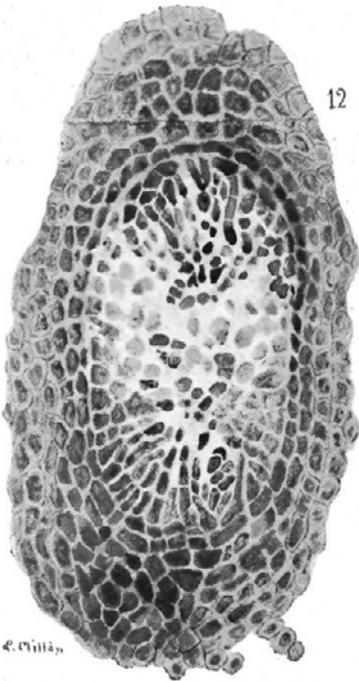
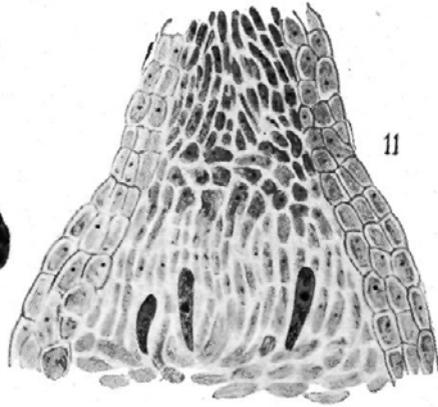


4

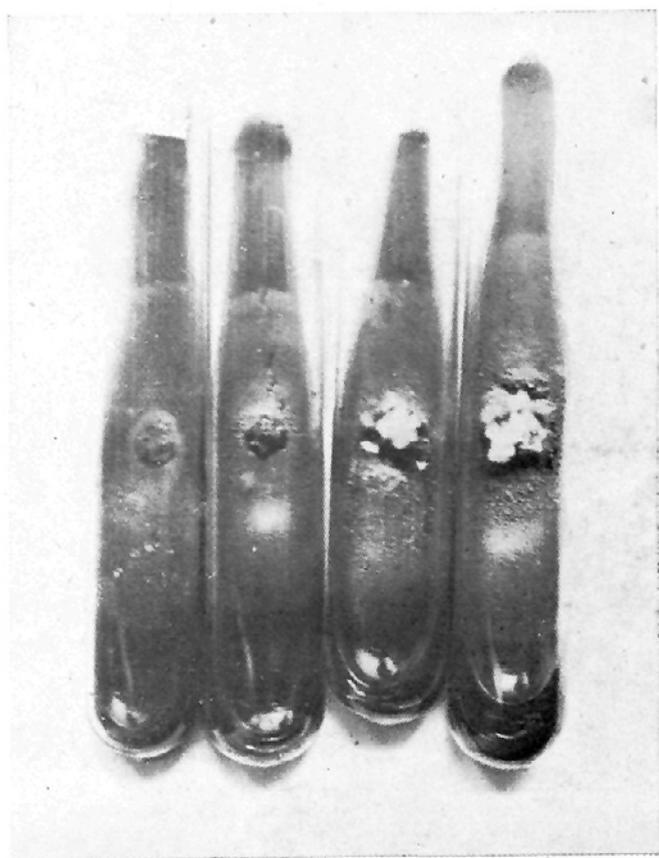
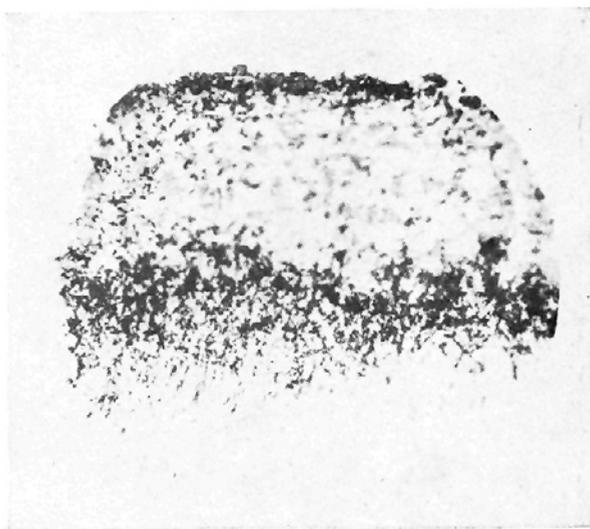
FIGURAS



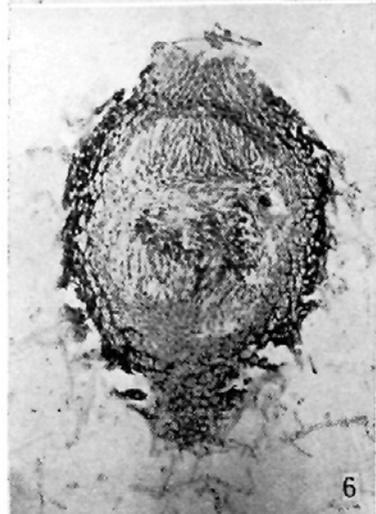
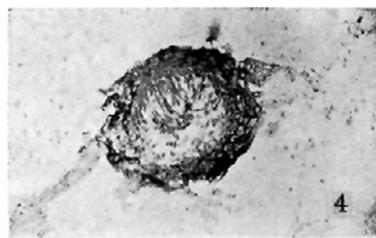
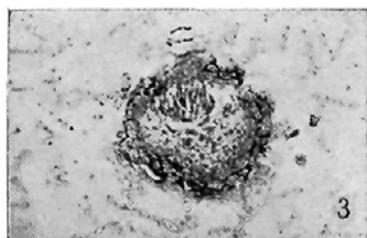
FIGURAS



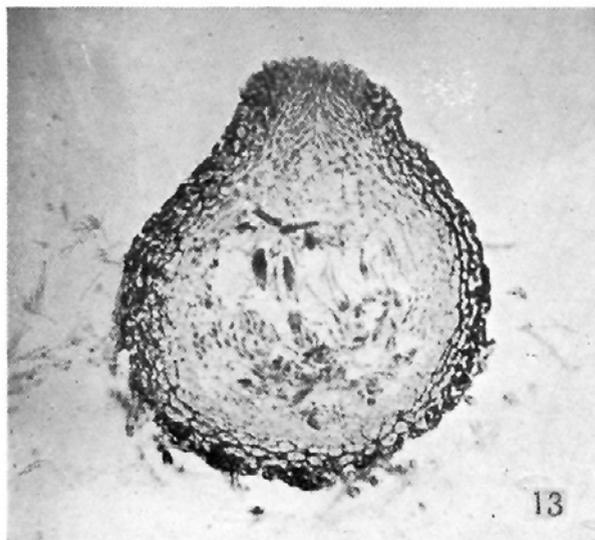
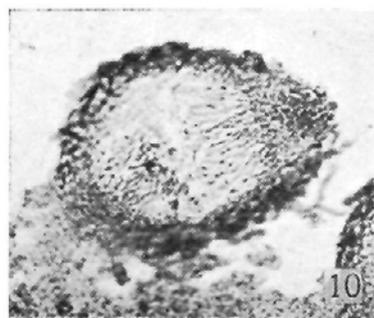
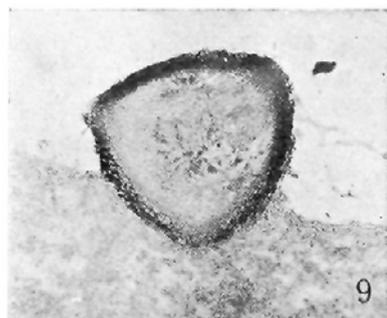
FOTOS 1-2



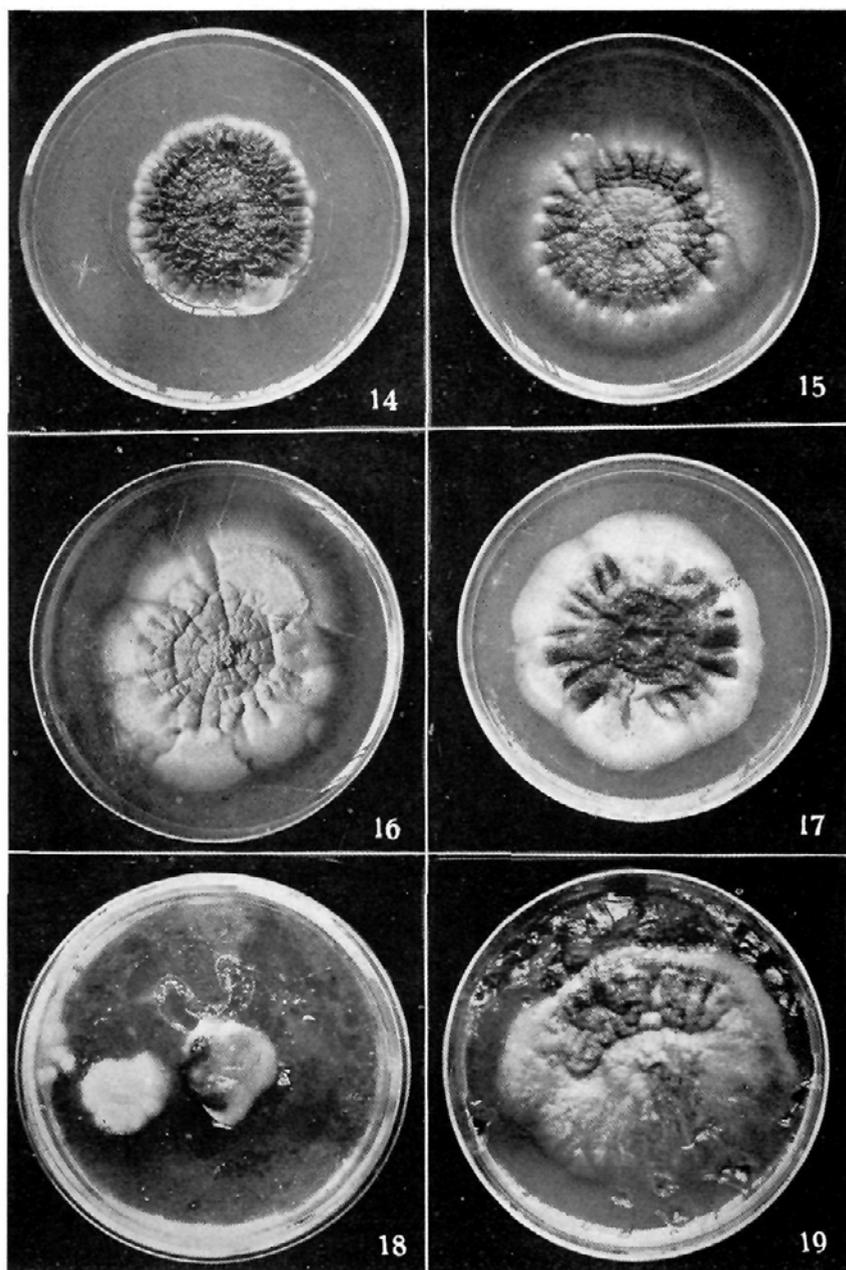
FOTOS



FOTOS



FOTOS



FOTOS 20-21

